VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

Affinity chromatography

Edited by

P. D. G. Dean
Agricultural Genetics Co. Ltd., Cambridge
Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4BH, UK

W. S. Johnson
Biochemist, University of Liverpool,
Liverpool, UK

F. A. Middle
Biochemical Consultant, P and S Biochemicals,
Liverpool, UK

IRL PRESS
Oxford·Washington DC

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Методы

Редакторы **П. Дин, У. Джонсон, Ф. Мидл**

Перевод с английского
канд. хим. наук **Б. А. Клящицкого**



Москва «Мир» 1988

ББК 24.4
А94
УДК 543.54+543.9

Авторы: Аберкромби Д., Алленмарк С., Арамэ С., Барабино Р., Бер Э., Бомгрен Б., Бонафу Дж., Бошети Э., Чейкен И., Добровольска Г., Дорнанд Дж., Фаверо Дж., Фишер Э., Грибнау Т., Инман Дж., Кейс М., Кризам Г., Лонгстаф К., Мани Дж.-К., Мацумото И., Мушинска Г., Прусак Э., Шевчук А., Уолтерс Р., Винзор Д.

А94 **Аффинная** хроматография: Методы: Пер. с англ./Под ред. П. Дина, У. Джонсона, Ф. Мидла. — М.: Мир, 1988. — 278 с., ил.

ISBN 5-03-000480-7

Книга зарубежных авторов (США, Великобритания и др.) посвящена одному из наиболее эффективных биохимических методов исследовзния — аффинной хроматографии. Книга содержит не только краткое теоретическое обсуждение рассматриваемой проблемы, но главным образом конкретные и подробные методики проведения того или иного эксперимента, что делает ее незаменимым практическим пособием в области аффинной хроматографии.

Для химиков и биохимиков, интересующихся проблемами выделения и очистки биополимеров, иммобилизации биологически активных соединений, биотехнологии.

А $\frac{2001040000\text{-}418}{041(01)\text{-}88}$ 130-88, ч. 1 **ББК 24.4**

Редакция литературы по химии

476041

ISBN 5-03-000480-7 (русск.)
ISBN 0-904147-71-1 (англ.)

© 1985 IRL Press Limited
© перевод на русский язык, «Мир», 1988

ОТ ПЕРЕВОДЧИКА

За последние 20 лет аффинная хроматография стала одним из наиболее эффективных методов выделения и очистки биополимеров. В настоящее время этот метод широко используется во многих лабораториях не только для рутинного выделения того или иного объекта, но и в качестве тонкого инструмента биохимического исследования, позволяющего изучать количественные параметры взаимодействия компонентов в биологических системах. В этой связи большое значение приобретает доступность практических руководств, посвященных химическим и методологическим аспектам аффинной хроматографии. В отечественной научной литературе остро ощущается отсутствие такого рода изданий. Вышедшая в 1980 г. в издательстве «Мир» монография Я. Турковой «Аффинная хроматография» в свое время несколько восполнила этот пробел, однако эта книга охватывает литературу только по 1976—1977 гг.

Предлагаемое вниманию советского читателя руководство вышло в серии книг, посвященных актуальным методам современной биохимии и родственных областей естествознания. В нем собраны подробные экспериментальные методики, охватывающие практически все аспекты аффинной хроматографии: получение, характеристика и применение твердых носителей, активация твердых носителей, иммобилизация на них лигандов различной природы, адсорбция и элюирование, анализ биоспецифических адсорбентов, использование аффинной хроматографии в препаративном масштабе и в условиях высокоэффективной хроматографии, количественная характеристика молекулярных взаимодействий, выделение клеток и другие. Хотя как практическое руководство данная книга призвана помочь исследователю прежде всего в экспериментальной работе, каждой главе предпослано небольшое теоретическое вступление. Особую ценность книге придает участие в ее написании ведущих специалистов по аффинной хроматографии из многих стран.

При переводе книги была использована терминология, наиболее широко применяемая в отечественной научной литерату-

ре. Так, для соединения (или группы атомов), отделяющего лиганд от поверхности твердого носителя, используется наиболее рациональный термин «вставка»; в литературе встречаются также эквивалентные термины «пространственная группа», «спейсер» и «ножка».

Для обозначения биоспецифической сорбции в статических условиях или одноразовой сорбции введен термин «бетч-процесс» (или «бетч-метод»).

Кроме того, поскольку в книге практически не цитируются работы советских ученых в этой области, мы посчитали необходимым дополнить ее списком некоторых обзоров по аффинной хроматографии, опубликованных в наших научных журналах (помещен в конце книги).

В целом же книга достаточно полно отражает современное состояние экспериментальной базы этого метода. Особенно полезные сведения могут почерпнуть молодые исследователи, не имеющие достаточного опыта работы в данной области. Можно полагать, что эта книга будет служить полезным практическим руководством для химиков, биохимиков и специалистов смежных областей, перед которыми стоят задачи выделения и очистки биополимеров и изучения молекулярных взаимодействий в биологических системах.

Б. Клящицкий

ПРЕДИСЛОВИЕ

Как показало обсуждение с ведущими специалистами в области аффинной хроматографии, назрела потребность в книге методического характера, которая дала бы возможность начинающему исследователю ознакомиться с некоторыми современными методиками, используемыми специалистами.

Метод аффинной хроматографии неотделим от методов иммобилизации. Развитие методических сторон хроматографии и синтетической химии методов иммобилизации определяет прогресс и методов аффинной хроматографии. Многие впечатляющие результаты были достигнуты за последние 17 лет, однако и период до 1968 г. был почти столь же интересен с точки зрения развития применения иммобилизованных биологически активных соединений.

Книга по практическим методам должна отличаться важными особенностями. Во-первых, в таком издании обязательно должны содержаться строгие описания основных методов эксперимента (т. е. методики) и, во-вторых, для расширения интереса к изданию необходимо включить новейшие достижения в данной области.

В этой книге сделана попытка собрать некоторые из известных нам лабораторных методик, хотя такой подход в определенной степени ограничен нашими собственными интересами, поскольку мы уже много лет работаем в области аффинной хроматографии в группе Ливерпульского университета. В книгу был включен довольно значительный материал, представленный некоторыми из наших коллег, а также учтены сделанные ими ценные практические замечания по методике иммобилизации. В благодарность за помощь и энтузиазм нашу книгу мы посвящаем своим коллегам.

После того как мы отобрали предлагаемые здесь методики, Бревер и Сассенфельд разработали метод «пришивки хвоста» к гену. Их работу можно рассматривать поистине как веху в аффинных методах, поскольку метод для выделения продукта гена определяется на уровне ДНК, а не после экспрессии продукта. Для заведомого придания молекуле белка положитель-

ного заряда в методе пришивки хвоста к гену используется введение в продукт гена N-концевых полиаргининовых хвостов. В свою очередь из этого следует, что для разделения продукта и клеточного белка могут быть использованы дешевые ионообменники на основе целлюлозы, а далее для удаления полиаргининового хвоста и реконструирования первоначального белка применяют карбоксипептидазу В. В результате при наличии возможности клонирования белка необходимость применения сложных и дорогостоящих методов очистки можно было бы вообще исключить.

Несмотря на это важное открытие, мы полагаем, что аффинная хроматография останется действенным лабораторным методом и изложение основ этого метода по-прежнему будет входить в учебные курсы биохимии.

Мы благодарны Г. Лонгу, Дж. Уолкеру, Д. Бёрчу и С. Холмзу за работу с литературой и также за подготовку большей части графического материала и С. Гриффитс за многолетнюю секретарскую работу и моральную поддержку.

П. Дин, Ф. Мидл, У. Джонсон

АВТОРЫ

Аберкромби Д. (*D. M. Abercrombie*), Laboratory of Chemical Biology, National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20205, USA; *Алленмарк С.* (*S. Allenmark*), Department of Chemistry, Linköping University, S-581 83 Linköping, Sweden; *Арамэ С.* (*S. Avrameas*), Unité d'Immunocytochimie, Institut Pasteur, 28, rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; *Барабино Р.* (*R. C. Barabino*), Owens/Illinois, Inc., Biotechnology/Toxicology, One Seagate, Toledo, OH 43666, USA; *Бер Э.* (*E. Ber*), Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; *Бомгрен Б.* (*B. Bomgren*), Department of Chemistry, Linköping University, S-581 83 Linköping, Sweden; *Бонафу Дж.* (*J. C. Bonnafous*), Laboratorie de Biochimie des Membranes, ER CNRS 228, ENSCM, 8 rue de l'Ecole Normale, 34075 Montpellier, France; *Бошети Э.* (*E. Boschetti*), Pointet-Girard, 35 Avenue Jean-Jaures, 92390 Villeneuve-La-Garenne, France; *Чейкен И.* (*I. M. Chaiken*), Laboratory of Chemical Biology, National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD 20205, USA; *Добровольска Г.* (*G. Dobrowolska*), Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; *Дорнанд Дж.* (*J. Dornand*), Laboratoire de Biochimie des Membranes, ER CNRS 228, ENSCM, 8 rue de l'Ecole Normale, 34075 Montpellier, France; *Фаверо Дж.* (*J. Favero*), Laboratoire de Biochimie des Membranes, ER CNRS 228, ENSCM, 8 rue de l'Ecole Normale, 34075 Montpellier, France; *Фишер Э.* (*E. A. Fischer*), F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., CH-4002 Basel, Switzerland; *Грибнау Т.* (*T. C. J. Gribnau*), Technology Department, Organon International BV, P. O. Box 20, 5340 BH Oss, The Netherlands; *Инман Дж.* (*J. K. Inman*), Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20205, USA; *Кейс М.* (*M. H. Keyes*), Owens/Illinois, Inc., Biotechnology/Toxicology, One Seagate, Toledo, OH 43666, USA; *Кризам Г.* (*G. Krisam*), Gambro Dialysatoren GmbH & Co. KG, 7450 Hechingen, Postfach 1323, FRG; *Лонгстаф К.* (*C. Longstaff*), Department of Pharmacology, Harvard Medical School, 250 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA; *Мани Дж.-К.* (*J.-C. Mani*), Laboratoire de Biochimie des Membranes, ER CNRS 228, ENSCM, 8 rue de l'Ecole Norbale, 34075 Montpellier, France; *Мацумото И.* (*I. Matsumoto*), Department of Chemistry, Faculty of Science, Ochanomizu University, Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan; *Мушинска Г.* (*G. Muszynska*), Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; *Прусак Э.* (*E. Prusak*), Biochemical Laboratory, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland; *Шевчук А.* (*A. Szewczuk*), Biochemical Laboratory, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Science, Wroclaw, Poland; *Уолтерс Р.* (*R. R. Walters*), Department of Chemistry, Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA 50011, USA; *Винзор Д.* (*D. J. Winzor*), Department of Biochemistry, University of Queensland. St. Lucia, Brisbane, Queensland 4067, Australia.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

S-АМЯА	S-ацетилмеркаптоянтарный ангидрид
АФБК	*м*-аминофенилборная кислота
АЭКМ	аминоэтилкарбамилметил
БСА	бычий сывороточный альбумин
ГМДА	гексаметилендиамин
ГПЭС	N-2-гидроксипиперазин-N′-2-этансульфоновая кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНФ	динитрофенил
ДТТ	дитиотреитол
ДЭАЭ	диэтиламиноэтил
КБТ	N,N′-карбонилди-1,2,3-бензотриазол
КДИ	N,N′-карбонилдиимидазол
КДТ	N,N′-карбонилди-1,2,4-триазол
КМ	карбоксиметил
ПВС	поливиниловый спирт
РНК	рибонуклеиновая кислота
СП	сульфопропил
СПТП	N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат
ТМЭД	N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин
ТНБС	2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота
ФХП	2,4,6-трифторо-5-хлоропиримидин
ЭДАК	хлорогидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭЭДХ	N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин
ADP	аденозиндифосфат
AMP	аденозин-5′-монофосфат
ATP	аденозинтрифосфат
Con A	конканавалин А
CPG	стекло с контролируемым размером пор
CTP	цитидинтрифосфат
GGT	γ-глутамилтранспептидаза
GTP	гуанозинтрифосфат
NAD	никотинамиддинуклеотид

ОСНОВЫ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Многие химические вещества, используемые при получении аффинных адсорбентов, токсичны, некоторые — едкие или огнеопасные. При описании методик далее обязательно обращалось внимание на меры предосторожности. При работе с органическими веществами необходимо придерживаться обычных правил техники безопасности, т. е. использовать лабораторную одежду, защитные очки и перчатки. С особой предосторожностью следует выполнять такие операции, как перегонка, использование вакуумных линий и газов в баллонах. Настоятельно рекомендуется использовать для работы вытяжной шкаф.

Глава 1.

ПОЛУЧЕНИЕ МАТРИЦ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ

Матрица, используемая для получения аффинных адсорбентов, должна соответствовать ряду требований, среди которых отметим наиболее важные: матрица должна иметь открытую и крупнопористую структуру и состоять из жестких сферических частиц, однородных по размеру и пористости; частицы должны быть химически и биологически инертными, но в то же время легко образовывать производные предпочтительно при комнатной температуре и в водной среде; в идеальном случае эти химические производные должны обеспечивать иммобилизацию лигандов, быть стабильными в течение определенного времени и не приводить к разрушению ни носителя, ни лиганда, особенно если последний — белок; для проведения современных экспериментов матрица должна выдерживать повышенное давление (5 бар) и хранение при низких температурах (например, —30 °С). Очевидно, что ни одна из доступных на сегодняшний день матриц не отвечает полностью всем этим требованиям.

2. АГАРОЗА

В качестве матрицы в аффинной хроматографии наиболее широко используется агароза. Это очищенный линейный содержащий галактозу (рис. 1) аэрогель-ксерогелевый коллоид, выделяемый или из агара или непосредственно из содержащих агар морских водорослей. Агароза характеризуется хорошей гелеобразующей способностью; она относительно биологически инертна и поэтому удобна в качестве носителей не только для аффинной хроматографии, но также и для гель-фильтрации. Агар и агароза — не синонимы, и различные агарозные препараты также могут значительно отличаться друг от друга по своим физико-химическим свойствам. Некоторые агарсодержащие морские водоросли приведены в табл. 1.

Таблица 1. Биологическое происхождение и структурные особенности галактанов красных морских водорослей

Галактан	Фракция	Углеводные единицы
Агар-агар	Агароза	D-Галактоза 3,6-Ангидро-L-галактоза
	Агаропектин	
	λ-фракция	D-Галактоза-2-сульфат D-Галактоза-2,6-дисульфат
Каррагинан	ϰ-Фракция	D-Галактоза-4-сульфат 3,6-Ангидро-D-галактоза
	ι-Фракция	D-Галактоза-4-сульфат 3,5-Ангидро-D-галактоза-2-сульфат
Фурцелларан		D-Галактоза D-Галактоза-4-сульфат 3,6-Ангидро-D-галактоза

2.1. Структура агарозы

Агар состоит из двух фракций: высокозаряженной агаропектиновой фракции и нейтральной агарозной фракции. «Нейтральная» агарозная фракция построена из повторяющихся агаробиозных звеньев, состоящих из чередующихся 1,3-связанных β-D-галактопиранозильных и 2,4-связанных 3,6-ангидро-α-L-галактопиранозильных остатков (рис. 1).

Однако дальнейшие исследования показали, что такое представление о структуре агарозы слишком упрощено; на самом деле агарозная фракция неоднородна и содержит как высокозаряженные, так и нейтральные молекулы агарозы. Агаробиозная матрица может содержать сульфатные, метоксильные, кетальпируватные и карбоксильные группы, хотя не всегда одновременно.

Содержание сульфата в агарозе часто используется как показатель ее чистоты: чем ниже этот показатель, тем лучше качество, поскольку многие нежелательные свойства агара приписываются наличию в нем ионных групп, главным образом,

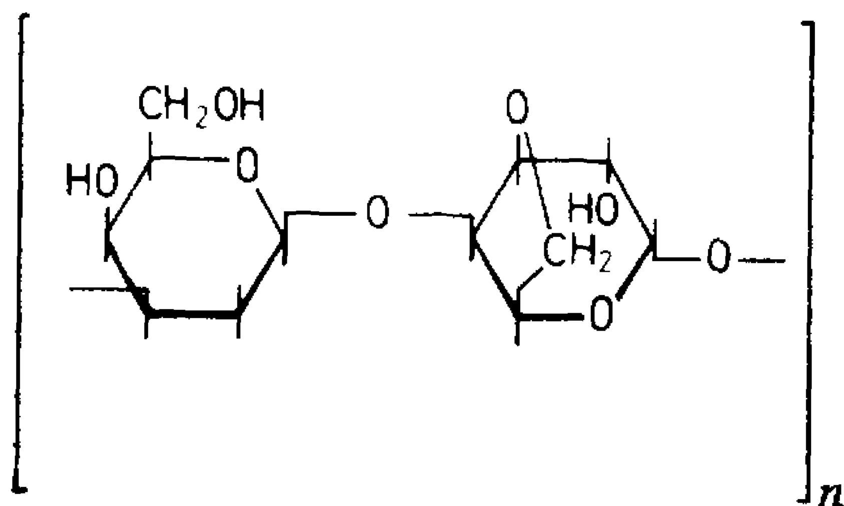


Рис. 1. Повторяющееся структурное звено агарозы. Для ясности водородные атомы не указаны [1].

вероятно, сульфата. Коммерческая сферическая агароза содержит до 0,37% (масс./об.) серы и, как видно из табл. 2, широко различается по содержанию сульфатных групп. Если ионные группы оказывают нежелательное влияние на разделение, то полезно предварительно обработать агар борогидридом натрия для удаления этих групп. Восстановление агарозных шариков проводят действием $NaBH_4$ в щелочной среде. Например, агарозу (7 мл) суспендируют в 1,0 М NaOH (5 мл), содержащем 2 мг/мл $NaBH_4$; восстановление проводят в течение 2 ч, а затем шарики промывают водой.

Таблица 2. Влияние типа агара и содержания серы на адсорбционную емкость по цитохрому *c* [2]. (Приведено с разрешения.)

Гель	Содержание полисахарида, % (масс./об.)	Адсорбционная емкость	Содержание серы, %
Продажная агароза	6	0,08	0,11
ЭКД-агароза		0,01	0,02
Продажный агар (шарики)	6	0,24	0,37
ЭКД-агар (шарики)	6	0,06	0,05
Восстановленный ЭКД-агар (шарики)	6	0,01	0,01

Вторичная структура агарозы, характеризующаяся наличием линейных полисахаридных цепей без ковалентной поперечной сшивки, вызывает дополнительные проблемы, включая: 1) потерю термической устойчивости; 2) уменьшение объема или 3) изменение степени набухания в средах с различной ионной силой и диэлектрической проницаемостью; 4) затрудняется замораживание и высушивание агарозной матрицы и 5) легкую растворимость в присутствии денатурирующих или хаотропных ионов. В результате действия многих органических растворителей происходят существенные и необратимые изменения структуры агарозы.

Структурная целостность, жесткость и пористость агарозного геля определяются его вторичной структурой, характеризующейся наличием нековалентных взаимодействий (водородных связей) между различными агарозными цепями.

На рис. 2 представлена предполагаемая структура агарозной матрицы. Агароза обладает достаточно большими порами, в которые легко проникают белки с молекулярными массами до нескольких миллионов, и в то же время жесткость агарозы достаточна для придания ее частицам сферической формы, что обеспечивает хорошую скорость потока. Полагают, однако, что сохранение размеров пор связано с образованием водородных

связей между тремя нитями тройной спирали агарозных цепей. Любой фактор, нарушающий эти связи, может вызвать разрушение общей структуры матрицы и растворение агарозы. Именно разрывом этих связей обусловлена термическая неустойчивость агарозы. Если в аффинной хроматографии приходится в качестве элюентов использовать мочевину, гуанидинхлорид, хаотропные ионы и некоторые поверхностно-активные вещества (ПАВ), разрушающие водородные связи, то агарозу следует поперечно сшивать (с эпихлорогидрином), что значительно повышает устойчивость матрицы, придает ей механическую прочность и бо́льшую устойчивость к хаотропным реагентам.

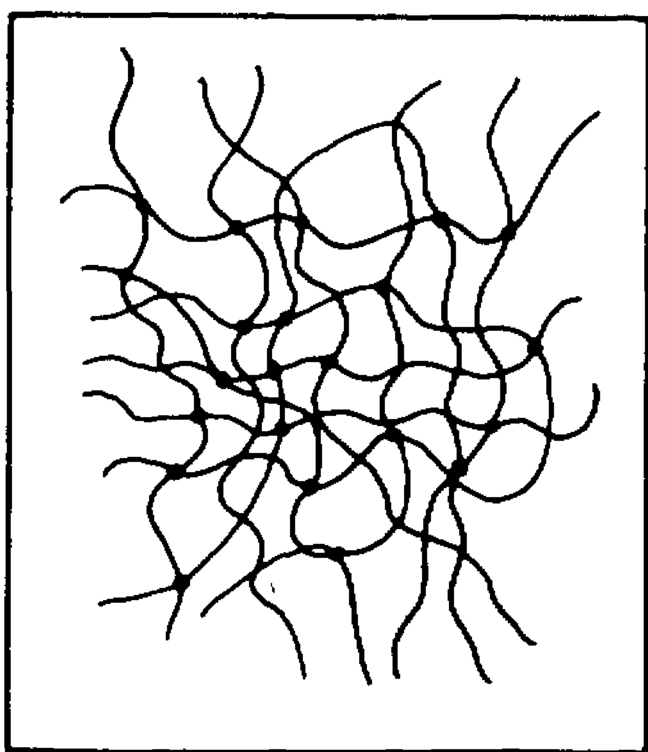


Рис. 2. Структура агарозы.

2.2. Получение поперечно-сшитой агарозы

1) Готовят суспензию агарозных шариков (100 мл) в 1,0 М NaOH (1 л), содержащем эпихлорогидрин (10 мл) и $NaBH_4$ (0,5 г).

2) Смесь нагревают при 60 °С в течение 2 ч с перемешиванием. Для этого удобно использовать роторный испаритель; колбу со смесью присоединяют к роторному испарителю и нагревают на водяной бане при 60 °С при включенном моторе. (*Внимание!* Не используйте вакуум, а надежно закрепите колбу или пробирку на вращающемся валу с помощью подходящего зажима.) Этот метод перемешивания имеет преимущество перед перемешиванием с помощью магнитной мешалки, поскольку в последнем случае может происходить разрушение шариков, особенно если перемешивающий стержень не имеет центрального выступа.

3) По окончании реакции шарики промывают горячей водой до нейтральной реакции промывных вод. Такой носитель можно использовать без дальнейшей обработки; однако в результате проведенных операций в матрицу может вводиться некоторое количество карбоксилатных групп. Для их удаления носитель помещают в автоклав и выдерживают там 1 ч при 120 °С в 2,0 М NaOH (50 мл), содержащем $NaBH_4$ (0,25 г); затем шарики промывают 1,0 М NaOH (150 мл), содержащим 0,5% (масс./об.) $NaBH_4$.

4) Подготовленный таким образом носитель промывают холодной водой, суспендируют в холодной воде и доводят до pH 4 с помощью уксусной кислоты.

5) Шарики хранят при 4 °C (не замораживая). В случае хранения в течение более чем нескольких недель необходимо добавить NaN_3 (до конечной концентрации 0,02% масс./об.) для предотвращения микробного роста.

2.3. Получение агарозных шариков

Для аффинной хроматографии обычно используют гранулированную агарозу (в форме шариков); она производится несколькими фирмами (табл. 3). Получение агарозных шариков

Таблица 3. Перечень некоторых фирм — производителей (или поставщиков) носителей, применяемых в аффинной хроматографии

В дополнение к приведенным здесь сведениям читателю рекомендуется обратиться к фирменным проспектам и описаниям, которые всегда сопровождают поставляемую продукцию и содержат уточнения.

Amicon Corporation. Аффинные матрицы на основе найлона (Matrex 101—102), карбоксилированные найлоны, поперечно-сшитая сферическая агароза (Matrex Gel), иммобилнзованные красителн (Matrex Gel Dye Ligand Screening Kit) и фенилборная кислота. Колонки с иммобилизованными красителями (по специальному заказу). Колонки и системы для ультрафильтрации.

Bio-Rad Laboratories. Стронтельные блоки для получения аффинных адсорбентов, содержащие вставки с концевыми амино-, карбоксильными, тиол-фенилртуть- и активированными карбоксильными группамн; агарозные гели (Biogel A), КМ-биогель А (CM-Biogel A), полиакриламидные гели (Bio-Gel P). Хроматографическое оборудование и колонки.

Pierce Chemical Company. Строительные блоки для получения аффинных носителей на основе стекла с контролируемым размером пор (CPG). Доступны носители со следующими лигандами: декстран, длинноцепочечные алкиламины, фенилгидразины, N-гидроксисукцинимидный эфир, *п*-нитрофениловый эфир, карбоксил, тиол, стабильная диазониевая соль, 8-гидроксихинолин, липоамид; КДИ-активированные носнтели: агароза, иммобилизованная фенилборная кислота (Glycogel B), полистирольные шарики, моднфицированные гидразином, алкиламином и многими другими лигандами.

Electro-nucleonics Inc. Стекло с контролируемым размером пор (CPG), содержащее различные лиганды, включая альбумин, гексиламин, этиламин и амннодипропиламин, гидразнд адипиновой кислоты и аминокапроат.

L'Industrie Biologique Francaise (IBF). Немодифицированные гели, агароза (Ultrogel A), полиакриламид-агарозные сополимеры (Ultrogel AcA), магнитные разновидности последних, глутаральдегидактивированные гели, гели со вставками, иммобилизованные лектины, гепарин, трисакриловые гели (Trisacryl).

Koch-Light-Genzym. Носители сферон (Spheron), полиакриламидные гели (Enzacryl), включая иммобилизованные гидразиды, политиолактоны, полиацетали.

LKB-Producter AB. Те же продукты, которые производит фирма IBF, а также хроматографическое оборудование, колонки и систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии белков.

E. Merck GmbH. Носители на основе целлюлозы, содержащие аминогексил, сукциниламинододецил, карбоксиметилгидразид, иммобилизованные фенилборонат, бензамидин, трипсин и ингибитор трипсина.

Продолжение

Miles Laboratories Inc. Наборы гидрофобных колонок от C3 до C12, гидрофобные агарозы, иммобилизованные на агарозе метиловый эфир 6-аминокапроил-D-триптофана, ингибитор трипсина из соевых бобов, Gly-Gly-L-Tyr(O-Bz)-L-Arg, L-лизин, L-тироксин, L-3,5,3-тринодотиронин, 6-аминокапроилфукозамин, *п*-аминофенилацетат ртути, 5′-[4-аминофенилфосфорилуридин-2′(3′)-фосфат], казеин, L-триптофан, L-тирозин, L-фенилаланин, конканавалин A, белок, связывающий фукозу, лектин из проростков пшеницы, агглютинин из соевых бобов, гемагглютинин A из *Lens culinaris,* гемагглютинин B из *Lens culinaris*, агглютинин из *Ricinus communis*, иммунохимические препараты, поли(L-лизин), сукцинилполи(L-лизин), сукцинилполи(DL-аланин)поли(L-лизин), гидразид адипиновой кислоты, полиакрилгидразид, сукцинилполиакрилгидразид, бромоацетилцеллюлоза, различные ферменты.

Marine Colloids Inc. Агарозные шарики (SeaSep AC).

Pharmacia — P. L. Biochemicals Inc. Агароза (2, 4, 6, 8 и 10% масс./об.); иммобилизованные на агарозе 1,6-диаминогексан, конканавалин A, цистеамин, гемоглобин, гексан, аденозин, моно-, ди- и тринуклеотиды, кофермент A-тиол, тиоловый лиганд, гексановая кислота, N-гидроксисукцинимидный эфир, ингибиторы трипсина из соевых бобов и фасоли лима, поли(A, C, G, I, I-C, U)-целлюлоза, иммобилизованные на целлюлозе нуклеотиды, ДНК (денатурированная и нативная), олиго(dT); различные производные сефарозы, суперозы (Superose) и сефарозы CL; ионообменники на основе сефарозы; различные марки сефадекса; сефадекс LH-20; различные марки сефакрила (Sephacryl); ионообменники на основе сефадекса; голубой декстран, красная и голубая сефароза CL-6B; строительные блоки для получения аффинных адсорбентов, включая аминогексил, карбоксигексил; CNBr-активированная сефароза 4B, CNBr-активированная сефароза 6 MB; эпоксиактивированная сефароза 6B; гидрофобные лиганды (октил-сефароза 4B); иммобилизованные лектины; фенил-сефароза CL-4B; белок A-сефароза CL-4B. Хроматографические колонки, насосы и другое оборудование, система для быстрой жидкостной хроматографии белков.

Rohm Pharma GmbH. Эупергит C (Eupergit C), эпоксиактивированные носители.

Serva Feinbiochemica GmbH & Co. Присоединенные к агарозе 1,2-диаминоэтан, 3,3′-диаминодипропиламин, сукцинилированные аналоги; аминопропил-*п*-аминобензилцеллюлоза, *п*-аминобензоил-3,3′-диаминодипропиламинагароза (Servachrom).

Sigma Chemical Company. Иммобилизованные на агарозе нуклеотиды, дигидразид адипиновой кислоты, ε-аминокапроновая кислота, N-(*п*-аминофенил)оксамовая кислота, кофермент A, конканавалин A, цистеамин, диаминогексан, фетуин, гемоглобин, α-лактальбумин, полинуклеотиды.

Исчерпывающую информацию об ассортименте продукции можно получить непосредственно от каждой фирмы.

определенных размеров описано в работе [3], причем качество носителя, в частности размер и форма гранул, зависит от многих факторов: природы и количества стабилизатора, природы органической фазы, скорости перемешивания, концентрации агарозы, относительных объемов и плотностей водной и органической фаз, формы и относительных размеров мешалки и реакционного сосуда (табл. 4).

2.4. Методика получения агарозных шариков

1) Круглодонную колбу объемом 1 л снабжают мешалкой из анодированного (окисленного) алюминия на стеклянном шлифе. В процессе гелеобразования вязкость суспензии постоянно меняется. Поэтому важно поддерживать относительно постоянную скорость перемешивания, используя мотор с переменной мощностью.

2) Готовят раствор агарозы (кипячением в круглодонной колбе). Для получения раствора агарозы с содержанием >3% (масс./об.) необходимо использовать автоклав при давлении 2 бар.

3) Перед нагреванием колбу со смесью агарозы и растворителя вакуумируют. Для достижения полного растворения

Таблица 4. Экспериментальные данные по получению шариков агарозного геля методом суспензионного гелеобразования

Концентрация агарозы (г агарозы на 100 мл воды)[a]	Объем толуола, мл	Объем CCl_4, мл	Стабилизатор[б]	Количество стабилизатора, г	Скорость перемешивания, об/мин	Размер шариков, меш (стандарт. США)
6	450	150	Сесквиолеат сорбитана	4,5	1700	100—170
8	445	155	Моностеарат полиоксиэтиленсорбитана	5	1500	60—100
10	440	160	Моностеарат полиоксиэтиленсорбитана	15	1700	170—300
12	430	170	Моностеарат полиоксиэтнленсорбнтана	25	1700	170—300

[a] Во всех опытах объем воды для растворения агарозы составлял 100 мл.
[б] Фирма-поставщик: Atlas Chemical Industries Inc., Chemicals Division (США).

при необходимости нагревание повторяют, особенно в случае приготовления растворов, содержащих >10% (масс./об.) агарозы.

4) Органическую фазу (см. табл. 4), содержащую стабилизатор, предварительно нагревают до 50 °С на водяной бане.

5) Органическую фазу добавляют к раствору агарозы и включают мешалку.

6) Через 1 мин реакционную колбу охлаждают холодной водой.

7) Через 5 мин шарики переносят на пористый стеклянный

фильтр и промывают эфиром (3 раза по 200 мл) для удаления органического растворителя.

8) Затем добавляют воду (1 л) и декантируют эфирный слой.

9) Остатки эфира, растворенного в водной фазе, удаляют, поместив реакционную смесь в колбу Бюхнера и вакуумируя последнюю на водоструйном насосе.

10) Для удаления очень мелких частиц гранулы промывают на фильтре и сите.

11) Однородность формы и диаметра шариков контролируют, рассматривая пробу носителя под микроскопом после окраски цибакроном голубым (как описано в гл. 6).

2.5. Свойства суперозы 6B, агарозного геля для высокоэффективной аффинной хроматографии

Супероза 6B — агарозная матрица с высокой степенью сшивки, образующая очень жесткий гель. Эффективность этой матрицы в качестве носителя для адсорбентов, используемых для разделения в условиях высокоэффективной хроматографии, обусловлена наличием поперечных сшивок, а также однородностью частиц по размеру (который характеризуется узким интервалом 20—40 мкм). По данным фирмы-производителя (Pharmacia) в колонке (1,6×60 см) при скорости тока 0,3 мл/мин создается, как правило, обратное давление менее 1 бар. Область фракционирования по молекулярной массе составляет $10^4 \div 4 \cdot 10^6$ для глобулярных белков и $10^4 \div 10^6$ для полисахаридов.

Супероза 6B обладает очень низкой неспецифической адсорбцией. Выходы белков обычно превышают 80%. Супероза 6B может быть использована в водной среде в интервале pH 3—14. Гель стабилен в растворах хаотропных реагентов (до 6,0 М). При работе с суперозой 6B можно использовать растворы этиленгликоля, этанола, диметилформамида, тетрагидрофурана, ацетона, хлороформа, дихлорометана и дихлороэтана — пиридина (50 : 50), но не рекомендуется использовать растворы мочевины при концентрациях $>$6,0 моль/л.

Суперозу 6B можно неоднократно использовать без заметных изменений ее пористости и жесткости для работы в автоклавах при pH 7,0 и 120 °С. Гель выдерживает давление до 4 бар. Обработка растворами анионных, катионных и неионных ПАВ не вызывает изменений свойств геля.

Перед упаковкой колонок с суперозой все растворы рекомендуется фильтровать и дегазировать. Аналогичным образом должны быть обработаны и вводимые на колонку образцы. Фирма Pharmacia располагает дополнительной полезной информацией об этом геле.

2.6. Магнитная агароза (магногель)

Магногель A4R представляет собой агарозу (4% масс./об.), сшитую эпихлоргидрином. Его магнитная природа, как и в случае магногеля AcA 44 (см. ниже), обусловлена включением внутрь шариков геля 7% (масс./об.) Fe_3O_4. Помимо магнитных свойств магногель A4R благодаря поперечным сшивкам обладает термической устойчивостью и стабильностью в присутствии диссоциирующих агентов. Он применяется в случаях, когда колоночный процесс нежелателен, например для разделений в вязких растворах или в присутствии частично растворимых материалов, таких, как клеточные фрагменты.

3. ЦЕЛЛЮЛОЗА

Целлюлоза представляет собой линейные полимеры, состоящие из β-1,4-связанных D-глюкозных единиц с редко встречающимися 1,6-связями.

3.1. Сферическая целлюлоза. Введение

В литературе описано большое число производных целлюлозы, которые постоянно использовались при разработке методологии очистки белков. При этом, однако, всегда отмечалось наличие ряда ограничений в применении целлюлозы не только в обычных методах очистки, таких, как ионообменная хроматография, но и в аффинной хроматографии. Эти ограничения связаны в основном с неблагоприятной физической структурой (недостаточной пористостью) и неподходящей геометрической формой отдельных частиц. Кроме того, дополнительные затруднения для такого использования целлюлозы обусловлены наличием обширных микрокристаллических участков внутри матрицы. Недавно большинство указанных недостатков, относящихся к применявшейся ранее фибриллярной, порошкообразной целлюлозе, были устранены; были разработаны новые виды целлюлозных носителей, например пористая сферическая целлюлоза.

3.2. Получение сферической целлюлозы

Разработано несколько методик для получения целлюлозы в виде сферических гранул; в основе всех этих методик лежит общий принцип и они включают следующие стадии:

1) получение жидкой фазы, содержащей целлюлозу или ее производное;
2) придание жидкости формы сферических капель;
3) затвердевание жидких капель;

4) регенерация целлюлозы в виде твердых сферических частиц;

5) заключительная промывка.

Для получения отдельных жидких капель, содержащих целлюлозу, жидкость (раствор целлюлозы) либо выдавливается через отверстия подходящего размера, либо диспергируется в среде, не смешивающейся с жидкой фазой, содержащей целлюлозу [4—17]. Размер частиц контролируется способом пропускания жидкости через выпускное отверстие, эффективностью перемешивания в процессе диспергирования или добавлением ПАВ.

Важная стадия процесса — затвердевание жидких частиц, т. е. завершение перехода раствор — гель. При этом главное внимание должно быть обращено на то, чтобы исключить деформацию сферической формы частицы, а также адгезию отдельных частиц с образованием агломератов. Для проведения процесса перехода раствор — гель используют солевые и кислотные регенерационные бани, нашедшие применение при производстве целлюлозных волокон; кроме того, состав диспергированной фазы изменяется таким образом, чтобы уменьшить растворимость целлюлозного компонента, температура понижается для достижения затвердевания плава (в случае ацетата целлюлозы) или уменьшения растворимости; с этой же целью проводят химическую обработку эпихлорогидрином в щелочной среде, в результате чего достигается сшивка. В заключение продукт дополнительно обрабатывают, благодаря чему сферическая целлюлоза имеет более пористую структуру. Заключительные процессы способствуют завершению регенерации целлюлозы и, кроме того, удалению продуктов разложения промыванием.

3.3. Свойства сферической целлюлозы

Стамберг и сотр. получили сферическую целлюлозу, используя процесс термического перехода раствор — гель, что приводит к образованию однородных сферических частиц. Геометрия и распределение частиц по размеру описаны в работе [18]. Сферическая целлюлоза — высокопористая матрица со сферическими гранулами, состоящая из чистой регенерированной целлюлозы (15%) и воды.

По своей пористой структуре набухшая сферическая целлюлоза подобна виниловым сополимерам макропористого (макросетчатого) типа. При коагуляции и регенерации целлюлозы из ксантогенатных растворов образуется микрогетерогенная структура, включающая участки кристаллического типа, связанные аморфным материалом. Благодаря этой микрогетерогенности шарики сферической целлюлозы обладают гораздо большей

жесткостью, чем частицы гомогенных полисахаридных гелей, получаемых, например, путем химической поперечной сшивки отдельных полимерных цепей эпихлорогидрином. Введение поперечно-сшивающих групп или других заместителей в макромолекулы может уменьшать образование кристаллических участков. По этой причине считают, что целлюлоза в виде сферических гранул механически более стабильна, чем, например, декстрановые гели сравнимой пористости.

Пористая структура целлюлозных сферических гранул может быть модифицирована в процессе получения, благодаря чему удается получить сферические целлюлозные носители с требуемыми характеристиками. С этой целью используется прямое удаление воды. Постепенное высушивание образцов целлюлозы способствует тому, что количество воды, удерживаемой в порах целлюлозы при последующем повторном набухании, уменьшается. Это происходит благодаря сокращению скелета и образованию новых водородных и других структурообразующих связей. Высушивание приводит к образованию более обширных новых микрокристаллических участков.

Пористая структура может быть изменена путем замены растворителя с последующим высушиванием и повторным набуханием. Вода, первоначально заполняющая поры, может быть обменена на любой другой растворитель без уменьшения объема пор, после чего пористость материала может быть соответствующим образом уменьшена. В зависимости от типа растворителя, из которого целлюлоза была высушена, образуются продукты, с характерной макросетчатой структурой, имеющие различную истинную пористость (пористость в сухом состоянии). Например, сферическая целлюлоза, высушенная из бензола, имеет пористость 83% (объем пор в процентах) и площадь поверхности 340 $м^2/г$. При высушивании из растворителей более высокой полярности получали продукты с меньшей пористостью; у продукта, высушенного из воды, в сухом состоянии поры осутствовали.

После повторного набухания в воде образцов целлюлозы, высушенных из растворителей с различной полярностью, матрица может удерживать различные количества воды. При изменении условий высушивания можно получить продукты с пористостью от 0 до 83% в сухом состоянии и от 50 до 90% в набухшем в воде состоянии.

Известно, что целлюлоза превосходит некоторые другие синтетические полимеры по своей химической реакционноспособности. Многие реакции протекают с особой легкостью ввиду пористости скелета целлюлозы и доступности реакционноспособных групп. В некоторых случаях целесообразно изменять пористость при помощи варьирования количества жидкости, используемой для набухания. Это может приводить к нежела-

тельному разбавлению раствора в реакции иммобилизации лиганда. Для преодоления этой проблемы может оказаться полезным заполнение объема между частицами инертной средой, например углеводородом, с тем, чтобы направить реакцию активации внутрь частиц.

Сферическая целлюлоза была предложена как удобная матрица для аффинной хроматографии ввиду правильной сферической формы ее частиц, высокой пористости и хорошей механической прочности, а также ярко выраженной гидрофильности. В одном сообщении [19] указывается на возможность хроматографии на иммобилизованном красителе, однако в работе [20] эти данные не подтвердились. В то же время ряд ферментов был успешно иммобилизован на сферической целлюлозе.

4. ДЕКСТРАН

Декстран — полисахарид, состоящий из остатков α-1,6-связанной глюкозы; он выделен из *Leuconostos mesenteroides*. Коммерческий продукт, сефадекс, применяющийся для гель-фильтрации (табл. 3), получают поперечной сшивкой декстранов эпихлоргидрином; сефадекс производится в виде сферических гранул. Наличие гидроксильных групп в полисахаридном каркасе делает эту матрицу более гидрофильной, чем агароза. Сефадекс может обратимо набухать из сухого состояния без значительных изменений хроматографических свойств геля после повторных циклов высушивания и набухания. Сефадекс химически весьма стабилен, выдерживает обработку 0,25 *М* NaOH при 60 °С в течение 2 мес или 0,02 *М* HCl в течение 6 мес [21]. Более того, влажный сефадекс сохраняет свойства после автоклавирования. Однако продолжительное действие окисляющих агентов может приводить к увеличению содержания карбоксильных групп.

Производные поперечно-сшитого декстрана были бы идеальной матрицей для аффинной хроматографии, но низкая степень пористости механически наиболее стабильных форм (от G-10 до G-75) сводит на нет их преимущества. Меньшая степень поперечной сшивки приводит к менее стабильным гелям. Активация декстрановых гелей обычными методами может вызывать дальнейшую поперечную сшивку геля, в результате чего молекулы ферментов даже с низкой молекулярной массой фактически не могут проникать внутрь шариков геля.

5. ПОЛИАКРИЛАМИД

Полиакриламидные гели состоят из углеводородного скелета с присоединенными к нему карбоксиамидными группами. На рис. 3 показана линейная полиакриламидная цепь.

Полиакриламидные гели стабильны в диапазоне pH 1÷10 и при использовании обычных элюентов. Они не содержат заряженных групп, и поэтому ионообменные взаимодействия с хроматографируемыми веществами минимальны. Полиакриламидные гели биологически инертны и вследствие этого не подвержены микробной атаке. Поскольку частицы геля сильно прилипают к чистой стеклянной поверхности, в работе [22] рекомендуется использовать силиконизированную стеклянную или полиэтиленовую лабораторную посуду. Недостаточная механическая прочность полиакриламида ограничивает его применение в качестве матрицы для аффинной хроматографии.

После соответствующей химической обработки на основе полиакриламидных гелей можно получить твердые носители,

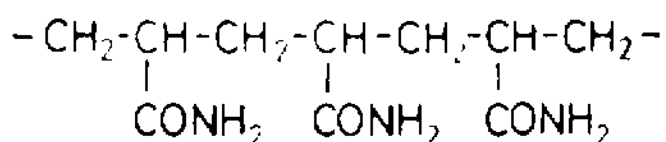


Рис. 3. Линейная полиакриламидная цепь.

удобные для присоединения ряда лигандов [22]. Так, при взаимодействии с большим избытком этилендиамина при 90 °С могут быть получены аминоэтилпроизводные, а при действии избытка гидразина при 50 °С — гидразидные производные. Реакцией с *п*-нитробензоилазидом в присутствии N,N′-диметилформамида, триэтиламина и тиосульфата натрия аминоэтилпроизводные полиакриламидных гелей могут быть переведены в соответствующие *п*-аминобензамидоэтилпроизводные.

Один из основных производителей полиакриламидных гелей — Bio-Rad Laboratories — выпускает продукт под торговым названием «биогель Р». Он получается сополимеризацией акриламида и N,N′-метиленбисакриламида. Биогель Р производится с различным размером пор (от биогеля Р-2 с пределом исключения по молекулярной массе 1800 до биогеля Р-300 с пределом исключения по молекулярной массе 400 000). Все виды биогелей выпускаются с размерами частиц 50—100, 100—200, 200—400 и 400 меш. Помимо этих продуктов фирма Bio-Rad Labs. выпускает гели-ионообменники, например слабый кислотный катионообменник биогель СМ, а также промежуточные продукты для аффинной хроматографии, такие, как аминоэтильные или гидразидные производные биогелей Р-2 и Р-60.

В торговлю поступают и предварительно активированные полиакриламиды, разновидность которых известна как энзакрилы (Koch-Light, Великобритания). Эти гели предназначены для иммобилизации ферментов. Энзакрил АН представляет собой гидразидное производное полиакриламидных гелей, а энзак-

рил AA — полиакриламидный гель, содержащий остатки ароматической кислоты. Энзакрил-полиацеталь представляет собой сополимер диметилацеталя N-акрилоиламиноацетальдегида и N,N′-метиленбисакриламида и связывает белки через NH_2-группы.

6. ТРИСАКРИЛ

Е. Бошетти (E. Boschetti)

Трисакрилы — серия гелей, производимых фирмой IBF Réactifs в Париже и распространяемых фирмой LKB. Они представляют собой синтетические гели, применяемые в качестве сорбентов для гель-фильтрации и носителей для ионообменной и аффинной хроматографии. Они получаются полимеризацией уникального мономера N-акрилоил-2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиола (рис. 4). Структура получаемого высокомолекулярного соединения представлена на рис. 5.

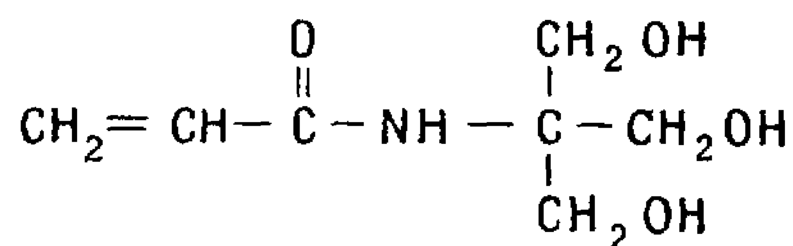


Рис. 4. Мономер для получения гелей трисакрила.

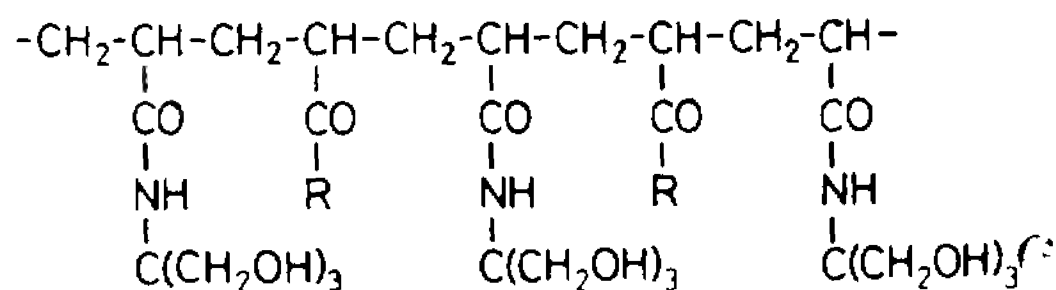


Рис. 5. Структура трисакриловых ионообменников. $R{=}NHCH_2COOH$ (карбоксиметилтрисакрил), $NH(CH_2)_2NEt_2$ (диэтиламиноэтилтрисакрил), $NHCH_2CH_2CH_2SO_3H$ (сульфопропилтрисакрил), NH_2 (незамещенный трисакрил).

Основная особенность этих макромолекул состоит в наличии трех гидроксиметильных групп и одной алкиламидной группы в каждом повторяющемся звене. Благодаря наличию этих функциональных групп полимеры имеют высокую гидрофильность и удобны для разделения биологических макромолекул, особенно белков, и клеток.

Амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиольные остатки создают микроокружение, благоприятствующее подходу гидрофильных веществ (белков) из раствора к поверхности полимера. Полиэтиленовая подложка расположена под слоем гидроксиметильных групп. Матрицы этого типа имеют очевидное преимущество

по сравнению с носителями на основе полиакриламида и гидроксиметилметакрилата, отличающихся значительной гидрофобностью. Кроме того, установлено, что шарики трисакрила не взаимодействуют с клетками, что можно объяснить неуглеводной природой трисакрила в отличие от классических хроматографических матриц. Возможно, что трисакрилы найдут важное применение в высокоэффективной хроматографии ввиду их устойчивости к повышенному давлению (до 3 бар) (рис. 6).

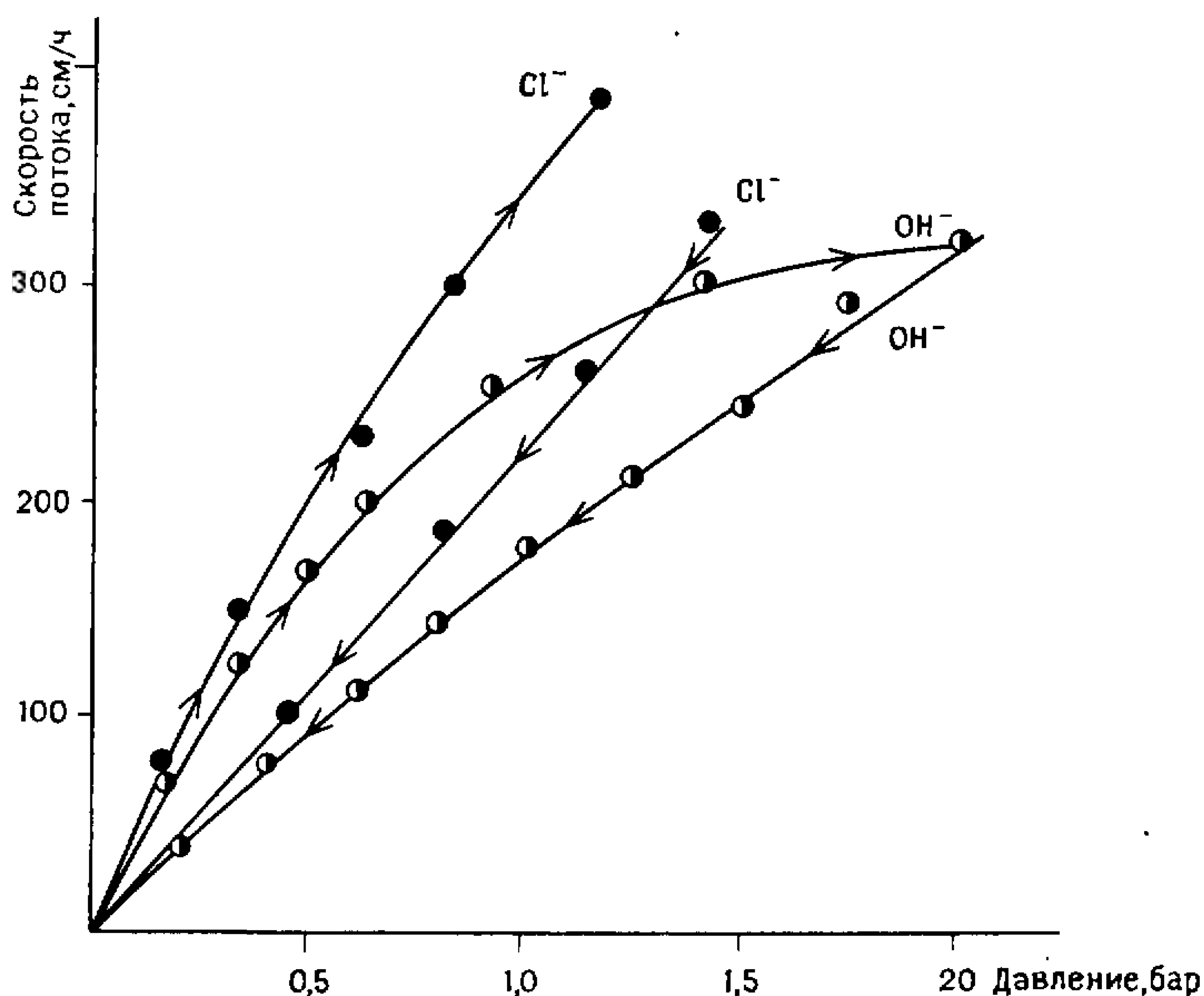


Рис. 6. Влияние давления на скорость потока для ДЭАЭ-трисакрила.

Трисакриловые гели очень гидрофильны, не подвергаются биодеградации и стабильны при низкой (—20 °С) и высокой (121 °С) температурах, а также к действию денатурирующих агентов. Они также устойчивы при кислотных pH, но менее стабильны при высоких pH из-за медленного гидролиза амидной связи. Наиболее важные свойства трисакрилов приведены в табл. 5.

Пределы исключения ионообменников, определенные по хроматографическому поведению глобулярных макромолекул, оказались высокими. На рис. 7 показано сравнительное поведение трисакрильной матрицы, на основе которой синтезируются ионообменники, и матрицы для гель-фильтрации — ультрогеля АсА 34. Из рис. 7 видно, что влияние молекулярной массы на параметры элюирования для трисакрилового геля незначительно.

Таблица 5. Некоторые характеристики трисакриловых гелей

Характеристика геля	КМ-трисакрил	ДЭАЭ-трис-акрил	СП-трисакрил
Размер шариков, мкм	40—80	40—80	40—80
Предел исключения по молекулярной массе	$\gg 10^7$	$\gg 10^7$	$\gg 10^7$
Плотность ионизованных групп, мкэкв./мл	200	300	230
рК карбоксильной группы	4,7	—	—
рК аминогрупп	—	6,2, 10,7	—
рК сульфоната	—	—	1,0
рН-стабильность	0—13	0—13	0—13
Устойчивость к действию ПАВ	Очень хорошая	Очень хорошая	Очень хорошая
Устойчивость к действию денатурирующих агентов	Очень хорошая	Хорошая	Очень хорошая
Устойчивость к нагреванию	Очень хорошая	Очень хорошая	Очень хорошая
Устойчивость к микробной деградации	Очень хорошая	Очень хорошая	Очень хорошая
Изменение объема при изменении рН и ионной силы	Незначительное	Незначительное	Незначительное

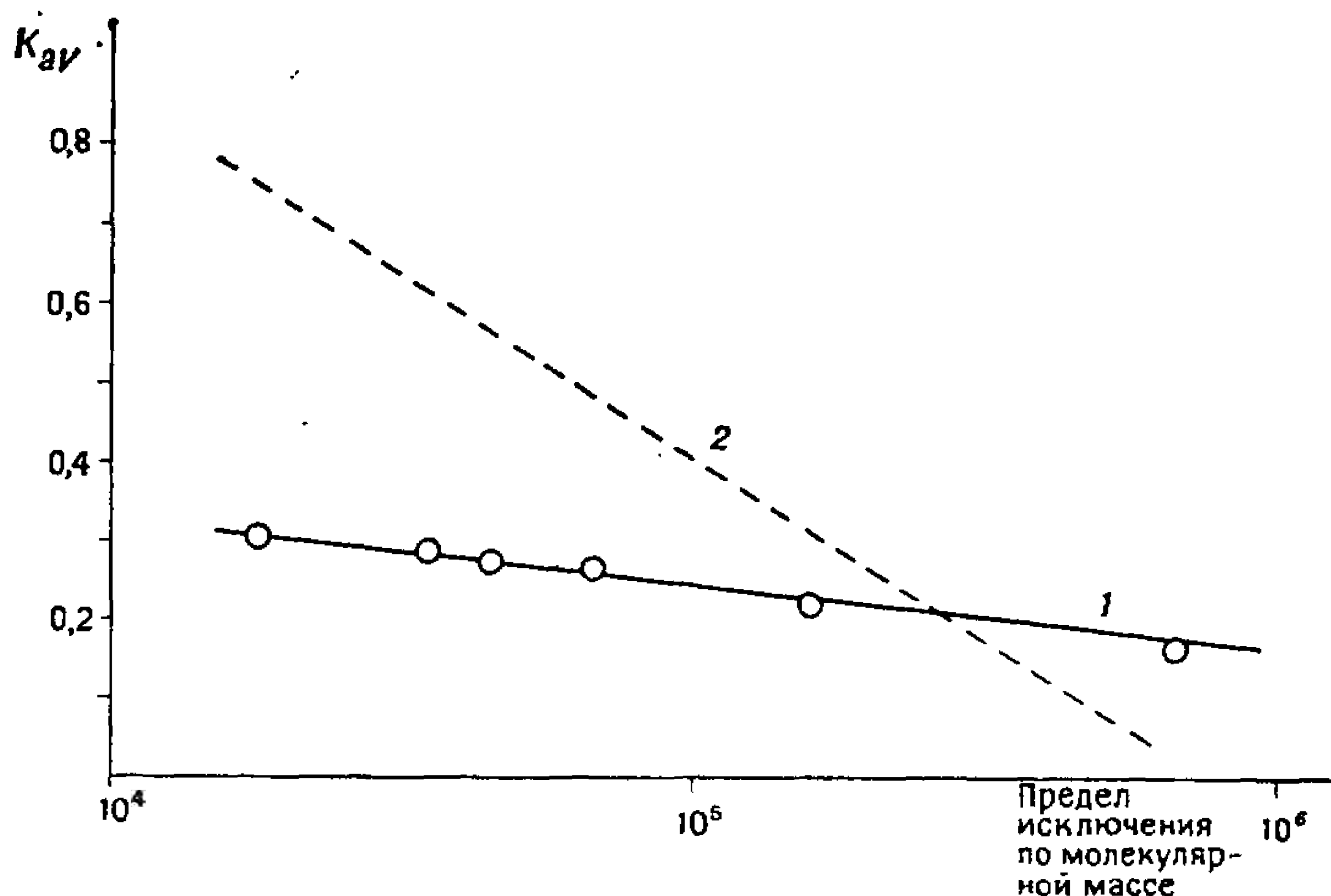


Рис. 7. Изменение константы K_{av} в зависимости от молекулярной массы для трисакрила (*1*) и ультрогеля АсА 34 (*2*).

Таблица 6. Емкости КМ-трисакрила и ДЭАЭ-трисакрила

Емкость геля	КМ-трис-акрил	DЭАЭ-трис-акрил
Полная, мкэкв./мл	200	300
По бычьему сывороточному альбумину[а], мг/мл	—	105
По гемоглобину человека[б], мг/мл	95	85
По цитохрому c[в], мг/мл	95	—

[а] В 0,05 М трис-HCl, pH 8,0, с концентрацией раствора бычьего альбумина 10 мг/мл.

[б] Для КМ в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,0; для ДЭАЭ в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 9,0. Концентрация раствора гемоглобина 5 мг/мл.

[в] В 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,4, с концентрацией цитохрома 3 мг/мл.

Емкость ионообменников на основе трисакрилового геля зависит от pH, ионной силы, температуры, природы буфера и концентрации образца (табл. 6).

6.1. Получение трисакрилового полимера в форме шариков

В лаборатории трисакриловый полимер можно получить по методике, описанной во французском патенте (№ 7 702 391).

1) В 1 л воды растворяют N-акрилоил-2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол (330 мг/мл) и N,N′-диаллилтартрадиамид в качестве поперечно-сшивающего агента (40 мг/мл).

2) Раствор нагревают на водяной бане до 55 °С и добавляют персульфат аммония (120 мг) и N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (1,6 мл).

3) Полученную смесь немедленно выливают в керосин (2 л) и перемешивают для образования эмульсии. В этих условиях протекает экзотермическая полимеризация с образованием твердых сферических частиц.

4) Частицы отделяют декантацией раствора и промывают 1%-ным (об./об.) водным раствором тритона Х-100; после отделения фракции 40÷80 мкм (сита) продукт окончательно промывают 1,0 М NaCl, водой и хранят при 4 °С в 0,02%-ном (масс./об.) NaN_3 (конечная концентрация).

6.2. Введение аминогрупп на шарики трисакрила (трисакрил-NH_2)

Шарики трисакрила (30 мл) обрабатывают 25%-ным (масс./об.) тетрафтороборатом цинка (22,5 мл) и эпихлорогидрином (60 мл) при 80 °С в течение 3 ч при осторожном перемешивании. По охлаждении реакционной смеси шарики промы-

вают дистиллированной водой и вновь суспендируют в 2,0 М аммиачном растворе хлорида аммония (pH 9,0; 100 мл).

Перемешивание продолжают еще 16 ч при комнатной температуре, шарики промывают дистиллированной водой и хранят при 4 °С в 0,02%-ном (масс./об.) NaN_3.

7. ГИДРОКСИАЛКИЛМЕТАКРИЛАТНЫЕ ГЕЛИ

Гидрофильные гидроксиалкилметакрилатные гели, предложенные Вихтерле и Лимом [23], могут быть получены полимеризацией суспензии гидроксиалкиловых эфиров метакриловой кислоты и алкилендиметакрилата. Путем изменения соотношения концентраций мономера и инертных компонентов можно менять в широких пределах число реакционноспособных групп, пористость и удельную поверхность геля [24]. Структура геля представлена на рис. 8.

Под торговым названием «сферон» эти гели производят фирмы Lachema (ЧССР) и Realco Chemical Co. (США). Гели об-

```
 CH3          CH3           CH3            CH3
 |            |             |              |
-C-----CH2 ---C-----CH2 ----C-----CH2 -----C-
 |            |             |              |
 C            CO            CO             CO
 |            |             |              |
 O            OCH2CH2OH     OCH2CH2OH      O
 |                                         |
 CH2                                       CH2
 |                                         |
 CH2                                       CH2
 |                                         |
 O                                         O
 |                                         |
 CO           CH3           CH3            CO
 |            |             |              |
-C-----CH2 ---C-----CH2 ----C-----CH2 -----C-
 |            |             |              |
 CH3          CO            CO             CH3
              |             |
              OCH2CH2OH     OCH2CH2OH
```

Рис. 8. Структура гидроксиалкилметакрилатного геля.

разуют регулярные шарики с превосходной химической и физической устойчивостью. Они хорошо выдерживают хроматографию под давлением и не меняют своей структуры после нагревания в течение 8 ч в 1,0 М растворе гликолята натрия при 150 °С после кипячения в течение 24 ч в 20%-ной (об./об.) соляной кислоте. Сфероны биологически инертны и, подобно полиакриламидным гелям, не атакуются микроорганизмами. Их можно использовать в органических растворителях. Гидроксильные группы геля имеют те же свойства, что и гидроксильные группы агарозы.

8. ПОЛИАКРИЛАМИД-АГАРОЗНЫЕ ГЕЛИ

Ультрогели АсА представляют собой полиакриламид-агарозные гели (рис. 9) с различной и стандартизированной пористостью в соответствии с типом геля. Выпускается пять типов АсА-гелей с различной пористостью, представляющих собой трехмерную полиакриламидную решетку с заключенным в ней агарозным гелем. Для этих гелей область фракционирования по молекулярной массе находится в интервале 1000÷1 200 000. Эти гели характеризуются наличием двух типов химических групп — гидроксильных групп агарозы и амидных групп полиакриламида, которые могут быть модифицированы для иммо-

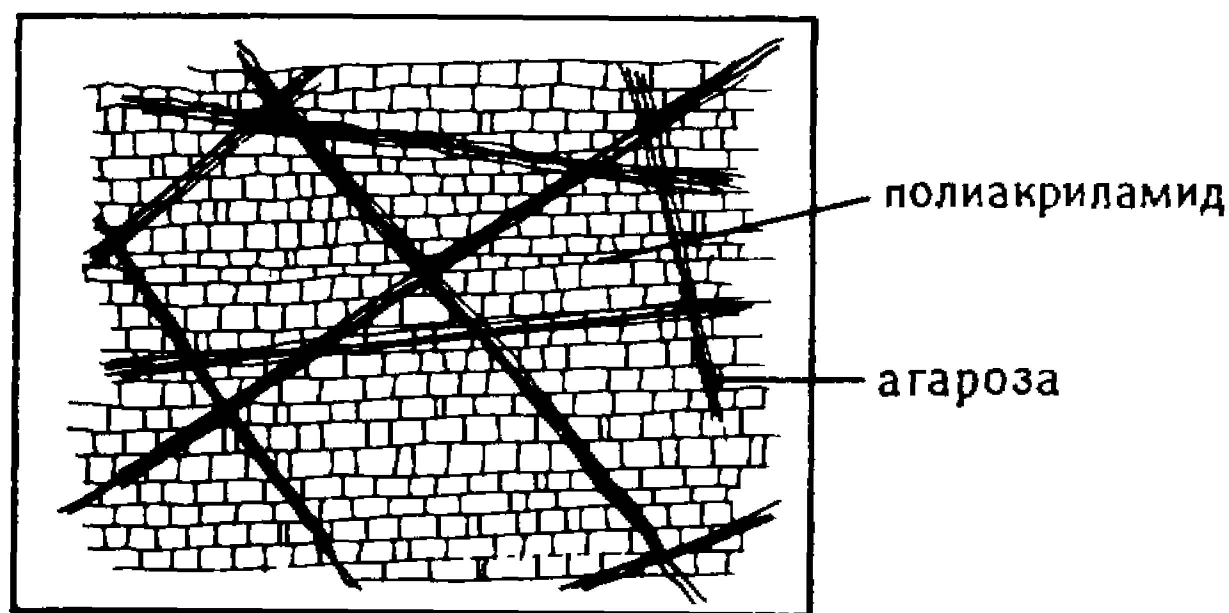


Рис. 9. Схематическое изображение матрицы ультрогелей АсА.

билизации лигандов. Шарики ультрогеля обладают более жесткой структурой и поэтому менее подвержены действию давления, чем обычные гели, что обеспечивает более высокие скорости потока.

Из ультрогеля АсА 44 получают магногель АсА 44 — носитель с магнитными свойствами. Включение внутрь полиакриламид-агарозных шариков 7% (масс./об.) оксида железа (Fe_3O_4) позволяет им взаимодействовать с магнитным полем. Этот гель используется в микроанализе и для получения продуктов в гетерогенной среде, содержащей частицы в суспензии. Использование магногеля в микроаналитических определениях позволяет исключить многочисленные стадии центрифугирования, применяемые в обычных анализах.

9. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ТРУБКАХ ИЗ ПОЛИВИНИЛАЦЕТАТЭТИЛЕНА

9.1. Введение

Манеке [25] описал различные реакционноспособные носители для иммобилизации ферментов; в качестве нерастворимых исходных материалов он использовал полимерные продукты,

содержащие поливиниловый спирт: гели поливинилового спирта, поперечно-сшитые терефталевым альдегидом; гидролизованные шарики поперечно-сшитого поли(винилацетата); трубки из поливинилацетатэтилена, покрытые поливиниловым спиртом, и главным образом синтетическую древесную целлюлозу, содержащую поливиниловый спирт. В аффинной хроматографии нашли применение другие носители, а именно найлон, полистирол, бумага, алгинат натрия и нерастворимые белки.

Трубки из поливинилацетатэтилена выпускаются фирмой Boehringer Mannheim.

9.2. Методы получения реакционноспособных трубок из поливинилацетатэтилена (рис. 10)

9.2.1. Активация трубок из поливинилацетатэтилена. Трубку из поливинилацетатэтилена (**I**, длина 500 см, внутренний диаметр 0,2 см) (рис. 10) заполняют 20%-ным (масс./об.) раствором NaOH (25 мл). Раствор многократно пропускают через трубку в течение 2 ч при 40 °С с помощью перистальтического насоса.

9.2.2. Модификация внутренней поверхности трубки эпоксипропоксибензальдегидом с образованием продукта **III**. Гидролизованную трубку **II** заполняют с помощью перистальтического насоса 1,0 М раствором 4-(2,3-эпоксипропокси)бензальдегида (25 мл) в диоксане и с помощью того же насоса рециркулируют раствор через трубку в течение 2 ч при комнатной температуре. Трубку промывают последовательно диоксаном и водой.

9.2.3. Покрытие внутренней поверхности трубки поливиниловым спиртом с образованием продукта **IVa**. Трубку **III** обрабатывают водным раствором (2,2% масс./об; 0,5 М по виниловому спирту) поливинилового спирта (20 мл) и концентрированной HCl (0,2 мл) в течение 15 ч при 25 °С с циркуляцией раствора. Трубку промывают водой.

9.2.4. Покрытие внутренней поверхности трубки поливиниловым спиртом в присутствии терефталевого альдегида с образованием продукта **IVб**. Трубку **III** обрабатывают водным раствором 2,2% (масс./об.) поливинилового спирта (20 мл) в концентрированной соляной кислоте (0,2 мл) с добавкой 1 мл 0,1 М терефталевого альдегида в диоксане. Смесь в трубке циркулируется в течение 30 мин при 25 °С. Трубку промывают водой, заполняют 0,1 М соляной кислотой, выдерживают еще 15 ч, затем вновь промывают водой.

9.2.5. Активация внутренней поверхности трубки 2,4,6-трихлоро-симм-триазином с образованием продуктов **Va** *и* **Vб** [26]. Труб-

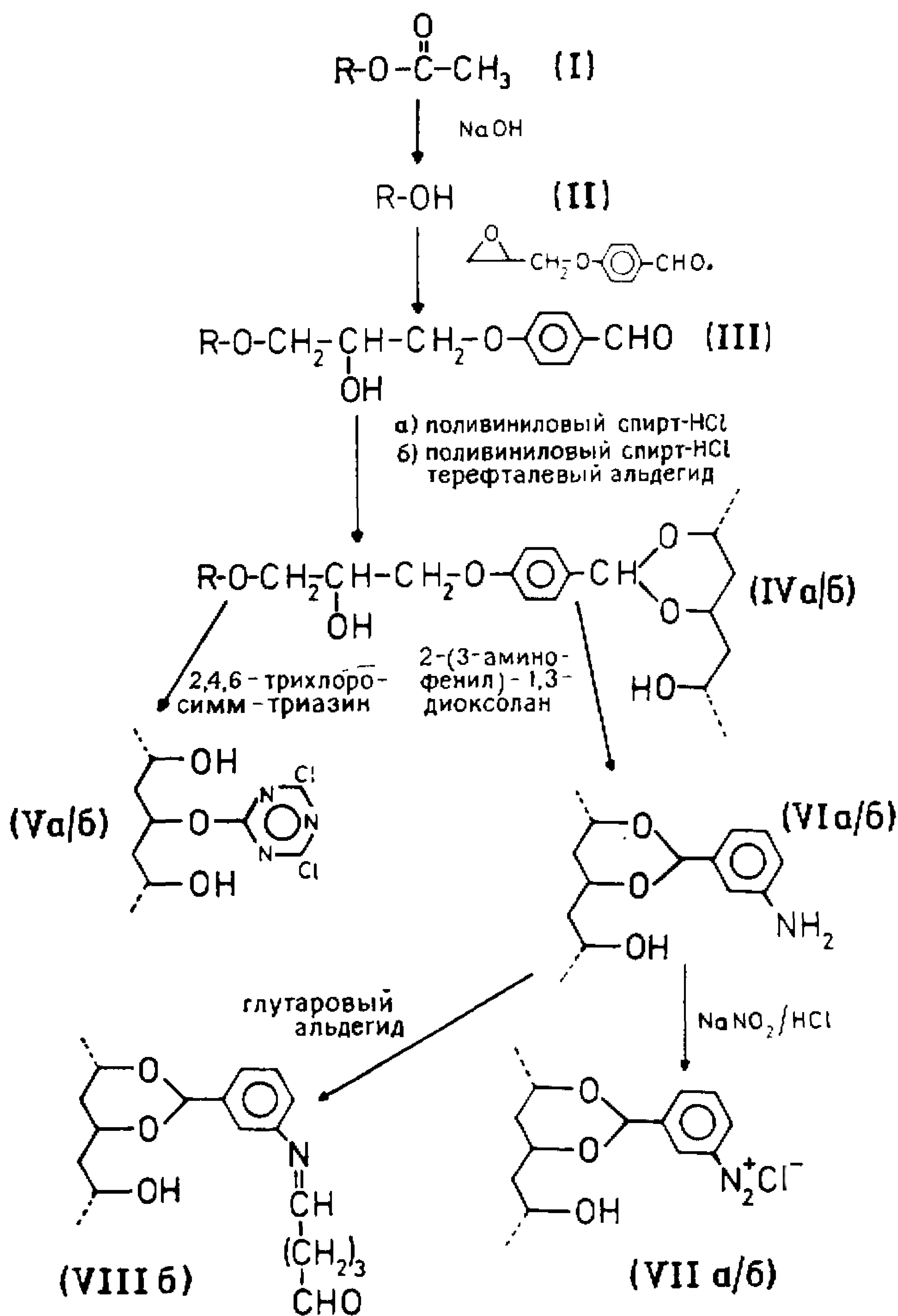


Рис. 10. Структура активированных производных трубок из поливинилацетатэтилена.

ку **IVа** или **IVб** длиной 100 см заполняют 20%-ным NaOH (10 мл) и оставляют на 30 мин при комнатной температуре; жидкость удаляют отсасыванием в вакууме и добавляют 10%-ный (масс./об.) раствор 2,4,6-трихлоро-*симм*-триазина в диоксане (10 мл). Циркуляцию раствора продолжают 10 мин, затем реакцию прекращают путем добавления 20%-ной (об./об.) уксусной кислоты (10 мл). Трубку промывают диоксаном и водой.

9.2.6. Модификация внутренней поверхности трубки реакцией с 2-(3-аминофенил)-1,3-диоксоланом с образованием продуктов

VIа и **VIб**. Трубку **IVа** или **IVб** длиной 500 см обрабатывают 1,0 *М* раствором 2-(3-аминофенил)-1,3-диоксолана (2 мл) в диоксане и концентрированной соляной кислотой (0,5 мл). Смесь циркулируют в трубке в течение 4 ч при 40 °С; трубку промывают 0,01 *М* соляной кислотой и водой.

9.2.7. Диазотирование с получением продуктов **VIIа** *и* **VIIб**. Смесь 0,5 *М* HCl (10 мл) и 1,0 *М* $NaNO_2$ (1 мл) при 0 °С циркулируют в течение 30 мин через трубку **VIа** или **VIб** длиной 100 см. Трубку промывают ледяной водой. Трубка подготовлена для иммобилизации ферментов.

9.3. Иммобилизация ферментов на поверхности активированных трубок

9.3.1. Иммобилизация трипсина на триазинактивированной трубке. Активированную трубку **Vа** или **Vб** длиной 100 см, содержащую дихлоро-*симм*-триазиновые группы, обрабатывают раствором трипсина (5 мг) в фосфатном буфере (pH 7,0, $I=0{,}15$) (5 мл). Циркуляцию раствора фермента продолжают в течение 3 мин, затем реакцию иммобилизации останавливают путем добавления 1,0 *М* аммиачного раствора NH_4Cl (pH 9,2; 3 мл). Трубку промывают фосфатным буфером (pH 7,0), 0,5 *М* NaCl и дистиллированной водой.

9.3.2. Иммобилизация трипсина на трубках **VIIа** или **VIIб** *реакцией азосочетания.* Раствор трипсина (5 мг) в фосфатном буфере (pH 7,0, $I=0{,}15$) (5 мл) вводят в реакцию с трубкой **VIIа** или **VIIб** (длина 100 см) при 0 °С. Циркуляцию раствора фермента продолжают в течение 2 ч, затем реакцию останавливают и удаляют раствор отсасыванием в вакууме. Трубку промывают фосфатным буфером (pH 8,0), 0,5 *М* NaCl и дистиллированной водой. Промывные растворы собирают в мерную колбу на 100 мл и определяют содержание белка с помощью реагента Фолина; рассчитывают количество иммобилизованного фермента. Трубку заполняют водой и хранят при 4 °С.

9.3.3. Иммобилизация глюкозооксидазы на трубках **VIIа** *или* **VIIб** *реакцией азосочетания.* Трубку **VIIа** или **VIIб** длиной 50 см с раствором 2 мг глюкозооксидазы в 0,5 *М* триэтаноламинном буфере (pH 8,0; 4 мл) выдерживают 1 ч при 0 °С при циркуляции раствора фермента. Продукт промывают 0,5 *М* триэтаноламинным буфером (pH 8,0), 0,5 *М* NaCl и дистиллированной водой.

9.3.4. Иммобилизация глюкозооксидазы на трубке **VIб** *посредством глутарового альдегида.* Трубку **VIб** длиной 50 см активируют путем циркуляции в ней 5% (об./об.) раствора глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 8,0, $I=0,15$) при комнатной температуре в течение 1 ч. Продукт (трубка **VIIIб**) промывают водой. Трубку **VIIIб** длиной 50 см заполняют раствором глюкозооксидазы (3 мг) в фосфатном буфере (3 мл; pH 8,0, $I=0,15$); циркуляцию раствора фермента в трубке продолжают в течение 4 ч при комнатной температуре. Трубку промывают фосфатным буфером (pH 8,0), 0,5 *M* NaCl и дистиллированной водой.

10. ЭУПЕРГИТ С

Эупергит С (фирма Rohm Pharma, Дармштадт) представляет собой оксирановые акриловые шарики, полученные сополимеризацией метакриламида, метиленбисакриламида, глицидилметакрилата и/или аллилглицидилового эфира. Эупергит С — электронейтральная и гидрофильная матрица. В виде водной суспензии эпоксид химически стабилен (в интервале pH $0\div12$) в течение нескольких часов при комнатной температуре, а в сухом виде — в течение месяцев при —30 °С. Химическая природа связи лиганд — матрица обеспечивает необратимую иммобилизацию лигандов (таких, как белки) на этой матрице без отщепления лиганда от матрицы в интервале pH $1\div10$.

Шарики имеют средний диаметр 150 ± 20 мкм (для высокоэффективной хроматографии эупергит С выпускается в виде микрошариков со средним диаметром 30 мкм) с макропористой структурой и низким уровнем удерживания воды. При использовании под давлением эупергит С имеет преимущество по сравнению с агарозными шариками. В случае эупергита С не наблюдается увеличения сопротивления потоку при увеличении давления от 0,1 до 1,0 бар. Напротив, при использовании шариков агарозы сопротивление потоку в колонке увеличивается, а при 0,6 бар колонка вообще забивается. Поэтому эупергит С вполне пригоден даже для процессов с нисходящим движением потока через закрепленный слой сорбента, обеспечивая постоянные и высокие скорости потока в течение длительного времени.

Внутренние поры этих оксирановых шариков доступны для белков с молекулярной массой $<150\,000$. Благодаря высокому содержанию эпоксидных групп шарики характеризуются хорошей емкостью. Показано, что 1 г сухих шариков связывает 140 мг альбумина.

3—139

10.1. Реакции эупергита с белком

10.1.1. Общая методика.

1) Перед связыванием препараты белка, содержащие аммониевые соли, должны быть обессолены путем диализа или ультрафильтрации; в последнем случае они могут быть одновременно переведены в фосфатный буфер. Белок (10—200 мг) растворяют в 1,0 М калийфосфатном буфере (pH 7,4; 3,5÷÷4,0 мл). Для приготовления этого буфера смешивают растворы 1,0 М KH_2PO_4 (23 мл) и 1,0 М K_2HPO_4 (77 мл) и добавляют к смеси 0,5 мг/мл этилового эфира *п*-гидроксибензойной кислоты (в виде раствора в изопропаноле). Раствор белка с помощью пипетки постепенно добавляют к эупергиту С (1,0 г). Для этой операции лучше всего использовать широкогорлую колбу с внутренним диаметром 15—20 мм; в случае слишком маленького диаметра колбы не может быть гарантировано необходимое проникновение жидкости в шарики. Колбу плотно закрывают пробкой и оставляют на 16—72 ч при комнатной температуре (21—25 °С). Перемешивания не требуется. Затем реакционную смесь переносят на пористый стеклянный фильтр (пористость 2—3) и промывают гель дистиллированной водой (2 раза по 50 мл), 1,0 М NaCl (4 раза по 50 мл) и в заключение буфером (2 раза по 50 мл), в котором предполагается использовать продукт. В качестве консерванта добавляют 0,5 мг/мл этилового эфира *п*-гидроксибензойной кислоты.

2) Удаление избытка оксирановых групп обычно не обязательно; при необходимости такой обработки см. разд. 10.2.

10.1.2. Другие варианты. Реакция белков с оксирановыми группами может протекать в широком диапазоне pH (pH 0÷÷12). Присоединение происходит как в кислотной области (например, в среде HCl—NaCl при pH 0÷3 или в ацетатном буфере при pH 4÷6), так и в сильнощелочной области (например, в 0,2 М Na_2HPO_4). Для каждого конкретного белка рекомендуется определять оптимальное значение pH связывания. Для многих белков оптимальна ионная сила 1,0 моль/л калийфосфата, хотя описаны случаи, когда при более низкой ионной силе были достигнуты лучшие результаты.

10.2. Образование производных эупергита С с низкомолекулярными соединениями

10.2.1. Реакции с меркаптанами. Эти эксперименты обязательно надо проводить в вытяжном шкафу.

1. *В водной среде.* Предварительно оксирановые шарики (1 г) промывают пять раз водой и фильтруют под вакуумом. 2 ммоля меркаптосоединения (например, бензилмеркаптана)

растворяют в воде (2 мл) и с помощью NaOH доводят pH до 8÷9. Раствор меркаптана добавляют к шарикам, тщательно перемешивают и оставляют смесь на ночь при 25 °С. Продукт промывают шесть раз дистиллированной водой (10 объемов). Степень присоединения контролируют с помощью элементного анализа на серу.

2. *В неводной среде.* Метиловый спирт [4 г; метанол не надо абсолютировать; при содержании воды 10% (об./об.), напротив, реакция ускоряется], содержащий тритон В [5 мг, 40%-ный (масс./об.) раствор гидроксида бензилтриметиламмония в метаноле], смешивают с бензилмеркаптаном (180 мг≈≈1,5 ммоля) и добавляют эупергит С (1 г). Смесь встряхивают в течение 72 ч при комнатной температуре (23 °С), затем фильтруют через пористый стеклянный фильтр и промывают метанолом (5-кратным объемом). Количество присоединенного меркаптана контролируют с помощью анализа на серу.

10.2.2. Реакции с гидроксилсодержащими соединениями, например с н-гексанолом. Металлический натрий (250 мг) растворяют в *н*-гексаноле (125 г) и добавляют эупергит С (25 г). Суспензию нагревают до 80 °С и выдерживают при этой температуре в течение 48 ч. По охлаждении смеси избыток гексанола отделяют фильтрованием; твердый носитель промывают метанолом (5 по 100 мл) до отсутствия *н*-гексанола в промывных водах. Продукт сушат в вакууме при 40 °С в течение 48 ч. Определяют содержание гексанольных остатков методом Цейзеля. 20% оксирановых групп связываются с гексанолом, в то время как 80% оксирановых групп превращаются в диол в результате щелочного гидролиза.

10.2.3. Реакция с диалкиламинами, например с гексаметилендиамином. Гексаметилендиамин (800 мг) растворяют в дистиллированной воде (9 мл) и добавляют эупергит С (1 г). Смесь осторожно перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре, затем переносят на пористый стеклянный фильтр и твердую фазу промывают водой до нейтральной реакции промывных вод. В заключение носитель промывают этанолом три раза и сушат в вакууме в течение 72 ч при комнатной температуре. Для контроля степени присоединения определяют содержание хлора после добавления к навеске носителя известного количества соляной кислоты. Реакция присоединения гексаметилендиамина должна пройти полностью (100%), т. е. 1 моль оксирановых групп присоединяет 1 моль гексаметилендиамина.

10.2.4. Удаление избыточных оксирановых групп (после иммобилизации лиганда). Содержание оксирановых групп составляет 800—1000 моль/г сухих шариков. Эта концентрация эпок-

сида в эупергите С наряду с макропористой природой матрицы часто приводит к значительной емкости по связыванию белков. Может также достигаться и высокая активность иммобилизованного продукта; приведем активность некоторых иммобилизованных ферментов:

Фермент	Активность[a], Е/г геля
Пенициллинамидаза (*Escherichia coli*)	500
Трипсин	600
β-Галактозидаза	500
Рибонуклеаза (поджелудочная железа быка; РНК из дрожжей в качестве субстрата)	90

[a] Во всех случаях единицы активности определялись по количеству (в мкмолях) субстрата, гидролизованного за 1 мин при 37 °С.

Специальная модификация матрицы или удаление избыточных оксирановых групп не обязательны для большинства ферментов. Однако высокое содержание оксирановых групп имеет важное значение для химической модификации матрицы. От этого фактора зависит, в частности, использование фенилборонат-эупергита. Гемоглобин A_{1c} связывается с этой матрицей, причем взаимодействие обеспечивается высокой концентрацией лиганда (CNBr-активация агарозы не обеспечивает такой концентрации лиганда) [*Миддл Ф. (Middle F. A.),* неопубликованные данные].

Обнаружено, что в некоторых случаях после присоединения белка сохраняется достаточное количество оксирановых групп для дальнейшей модификации матрицы с целью придания ей более анионного, катионного, гидрофильного или гидрофобного характера. Это достигается реакцией с соответствующими низкомолекулярными соединениями (например, сульфгидрильными или аминосоединениями), содержащими желаемые функциональные группы. Так, значительная стабилизация пенициллинамидазы (*E. coli*), иммобилизованной на эупергите С, против щелочной дезактивации может быть достигнута модификацией реагентом Клеланда или другими дисульфгидрильными соединениями.

Однако в случае таких лигандов, как антитела или антигены, следует удалять избыточные оксирановые группы. По этой причине фирмы-производители рекомендуют альтернативные методы иммобилизации. Подробности об этих методах приводятся в специальных руководствах фирмы Rohm Pharma. Один из примеров приводится ниже в разд. 10.2.5.

10.2.5. Методика. Обработка меркаптоэтанолом приводит к блокированию эпоксидных групп при сохранении электронейтральной и гидрофильной природы матрицы. Влажные шарики, содержащие присоединенный белок, промывают на пористом стеклянном фильтре (пористость 2) 0,01 М фосфатным буфером (pH 8,0; 10 объемов). Добавляют 5%-ный (об./об.) водный раствор меркаптоэтанола (pH до 7,6÷8,0 доводят с помощью NaOH) на 1 г влажных шариков и оставляют на ночь при комнатной температуре. Продукт промывают дистиллированной водой (10 раз пятикратными объемами) и переносят в буфер, в котором его предполагается использовать. Влажные шарики хранят при 4 °С. Для предотвращения микробного роста добавляют формальдегид.

11. ГРАНУЛИРОВАННЫЙ ПОРИСТЫЙ ОКСИД АЛЮМИНИЯ

Р. К. Барабино, М. Г. Кейс (R. C. Barabino, M. H. Keyes)

11.1. Введение

Исследования гранулированного пористого оксида алюминия (KIMAL; кимал) в качестве твердого носителя для иммобилизации ферментов начались в 1974 г, главным образом из-за ограничений в скорости потока при применении полисахаридных носителей в клиническом приборе Partitioned Enzyme-Sensors. Например, в приборе Owens-Illinois BUN [27] образец, содержащий мочевину, проходит через колонку с иммобилизованной уреазой (3×76 мм) и далее смешивается с потоком, содержащим сильное основание. При этом выделяется аммиак, который и определяется при помощи газового электрода.

Скорость потока в этом приборе приблизительно 1 мл/мин. Если используется полисахаридный носитель, то часто происходит уплотнение сорбента в колонке, что приводит к неустойчивой скорости потока. Считается, что полисахаридные носители не отвечают требованиям колоночного процесса по двум основным причинам: 1) при клинических анализах в автоматическом режиме (>50 анализов/ч) обычно требуются высокие скорости потока, при которых происходит уплотнение полисахаридных шариков, и 2) при разрушении полисахаридных шариков они могут образовывать комки, что также ограничивает применяемые скорости потока и уменьшает срок эксплуатации детектора [28].

Таким образом, возникла потребность в поиске пористого неорганического носителя, удовлетворяющего нескольким требованиям. Носитель должен:

1) быть физически устойчивым к деформации или разрушению при высоких скоростях тока;

2) обеспечивать связывание белков с высоким выходом и с сохранением активности, достигаемой при использовании многих органических носителей;

3) допускать широкий выбор размеров пор и частиц;

4) характеризоваться стабильностью состава в течение длительного времени.

С целью удовлетворения этих требований был разработан гранулированный пористый оксид алюминия — кимал.

11.2. Получение иммобилизованных смесей (общая методика)

Все реагенты должны быть по крайней мере коммерческой чистоты; они могут быть получены от фирм Aldrich Chemical Company, Fisher Scientific Company или Sigma Chemical Company.

1) Гранулированный пористый оксид алюминия (кимал) промывают путем декантации деионизованной водой или 0,1 *М* HCl для удаления мелких частиц и активируют в 6,0 *М* HCl в течение 1,5—3,0 ч под вакуумом для удаления находящегося в порах воздуха.

2) Готовят раствор материала для иммобилизации в буфере и хранят его при 4 °С, пока оксид алюминия отмывается от кислоты.

3) Супернатант декантируют, заливают оксид алюминия буфером, суспензию вакуумируют (водоструйный насос) и оставляют (для установления равновесия) на 0,5—1,0 ч.

4) К подготовленному таким образом оксиду алюминия добавляют материал для иммобилизации и оставляют (для адсорбции) на 0,5—1,0 ч.

5) Добавляют раствор бифункционального поперечно-сшивающего агента (за один прием или постепенно в течение 4 ч). Перемешивание можно осуществлять при помощи подвесной мешалки.

6) Реакцию проводят в течение ночи при комнатной температуре.

7) Продукт тщательно промывают водой и затем буфером.

8) Хранят суспензию в буфере при 0÷5 °С.

Количество связанного материала может быть определено термогравиметрическим анализом; результат выражают в процентах (потеря массы после нагревания при 500 °С).

11.3. Результаты и обсуждение

В табл. 7 приведены характеристики нескольких носителей, использованных для иммобилизации уреазы. Пористый оксид алюминия, разработанный Owens-Illinois, характеризуется вы

Таблица 7. Характеристики носителей, использованных для иммобилизации уреазы

Матрица	Размер частиц, мкм	Активность, ед./г	Характеристика выхода элюента с колонки при подаче его со скоростью 0,5 мл/мин	Механическая устойчивость	Литература
Сефадекс					
G-25	100	1	Хороший	Хорошая	30
G-200	80	115	Удовлетв.	»	31
G-200	80	300	»	»	30
Сефароза					
6B	180	500	»	»	30
4B	80	1500	»	»	30
Стекло					
Биогласс 1000	75	15	Хороший	»	32
Стекло с контролируемым размером пор (GPC 10)	175	20	Плохой	»	32
Силикагель					
Cab-O-sil (M7)	<40	70	»	»	32
Полипор (polypore) (8a-437)	<100	80	»	Удовлетв.	31
Оксид алюминия					
Кислотный непористый	150	135	Очень хороший	Хорошая	31
Нейтральный	150	13	»	»	31
Основный	150	58	»	»	31
Кимал	325	450	»	»	31
	275	800	»	Очень хорошая	31
	160	1500	Хороший	»	31

сокой связывающей емкостью по ферменту, нормальной скоростью потока, очень хорошей механической устойчивостью и хорошей стабильностью состава. Образцы уреазы, иммобилизованной на оксиде алюминия в колонках анализатора Kimble Blood Urea Nitrogen Analyser, как правило, давали воспроизводимые результаты (при 90% конверсии) после анализа 1000 введенных образцов [29].

Исходные активности иммобилизованной на оксиде алюминия уреазы сопоставимы с активностями, достигаемыми при применении полисахаридных носителей, а стабильность полученных неорганических продуктов и измеряемые скорости потока оказались очень хорошими. В результате легко достигается быстрый анализ образцов.

При изучении многокомпонентной системы иммобилизованных ферментов для определения α-амилазы в биологических жидкостях [35] было продемонстрировано связывание субстратов с кималом. В этой системе был использован крахмал, присоединенный к активированному кислотой кималу по методике, описанной для ферментов [36]. Количество связавшегося субстрата определяли по адсорбции иода или термогравиметрическим анализом. В табл. 8 приведены данные по количеству субстрата, связанного с оксидом алюминия, для некоторых образцов.

Таблица 8. Примеры субстратов, присоединенных к оксиду алюминия (кимал)

Крахмал	Содержание субстрата, мг крахмала/г кимала	Литература
Linthner (растворимый)	0,010	33
Амилоза, активированная кислотой	0,112	31
Амилоза	0,027	34
Амилоза	0,045	34
Амилоза, активированная декстраназой	0,099	31
Амилоза, активированная имидазолом	0,015	31
CNBr-активированная амилоза	0,121	31
ДЭАЭ-декстран	0,500	34

На рис. 11 отражена последовательность движения образца при определении α-амилазы при помощи клинического прибора. При пониженных скоростях потока получены четыре пика. Считают, что эти пики отражают разделение изоферментов на колонке с иммобилизованным субстратом. Единственный пик, полученный при высокой скорости потока (>0,5 мл/мин), был далее разделен на два пика при умеренной скорости потока (>0,2 мл/мин, но <0,5 мл/мин), каждый из которых давал два хорошо разделенных пика при низкой скорости потока (<0,2 мл/мин); таким образом, были получены все четыре пика. Литературные данные, касающиеся выхода с хроматографической колонки α-амилазы, указывают, что смесь компонентов α-амилазы может быть электрофоретически разделена на четыре компонента — два изофермента панкреатического происхождения и два изофермента из слюны [37].

Уникальные свойства кимала, разработанного в лаборатории авторов, позволили использовать оксид алюминия в качестве неорганического носителя не только для иммобилизации ферментов, но и для получения аффинных адсорбентов.

12. СТЕКЛО С КОНТРОЛИРУЕМЫМ РАЗМЕРОМ ПОР

Стекло с контролируемым размером пор — наиболее широко применяемая матрица неорганической природы для иммобилизации биологических молекул. Относительно небольшое число работ посвящено использованию стекла в качестве матрицы для аффинной хроматографии. Известно, что немодифицированное стекло неспецифически адсорбирует ферменты и заметно растворимо при щелочных pH (>8,0). Стекло обладает высокой механической прочностью, термической устойчивостью и, будучи аэрогелем, химически совместимо с большинством органических растворителей.

Стекло с контролируемым размером пор синтезируют продолжительным нагреванием некоторых боросиликатных стекол при 500—800 °С. Результатом такого отжига является разделение стеклянной смеси на боратные и силикатные фазы. После обработки кислотой обратная фаза растворяется и получается матрица с очень маленькими канальцами и порами (25—70 Å). Распределение полученного стекла по размеру пор чрезвычайно узкое; стекло с контролируемым размером пор имеет наиболее однородную пористость из всех доступных на сегодня матриц.

Стекло с контролируемым размером пор содержит 96% диоксида кремния и 4% бората со следами других неорганических оксидов. Основная часть общего содержания бора (до 30% бората) приходится на поверхностные слои стекла. Расположенные на поверхности остатки борсодержащих кислот Льюиса вызывают адсорбцию нуклеофилов, таких, как аминогруппы белков и/или ионы аммония, с образованием положительно заряженных центров, приводящих к неспецифической адсорбции.

Для предотвращения ионной адсорбции ферментов на поверхности стекла его под-

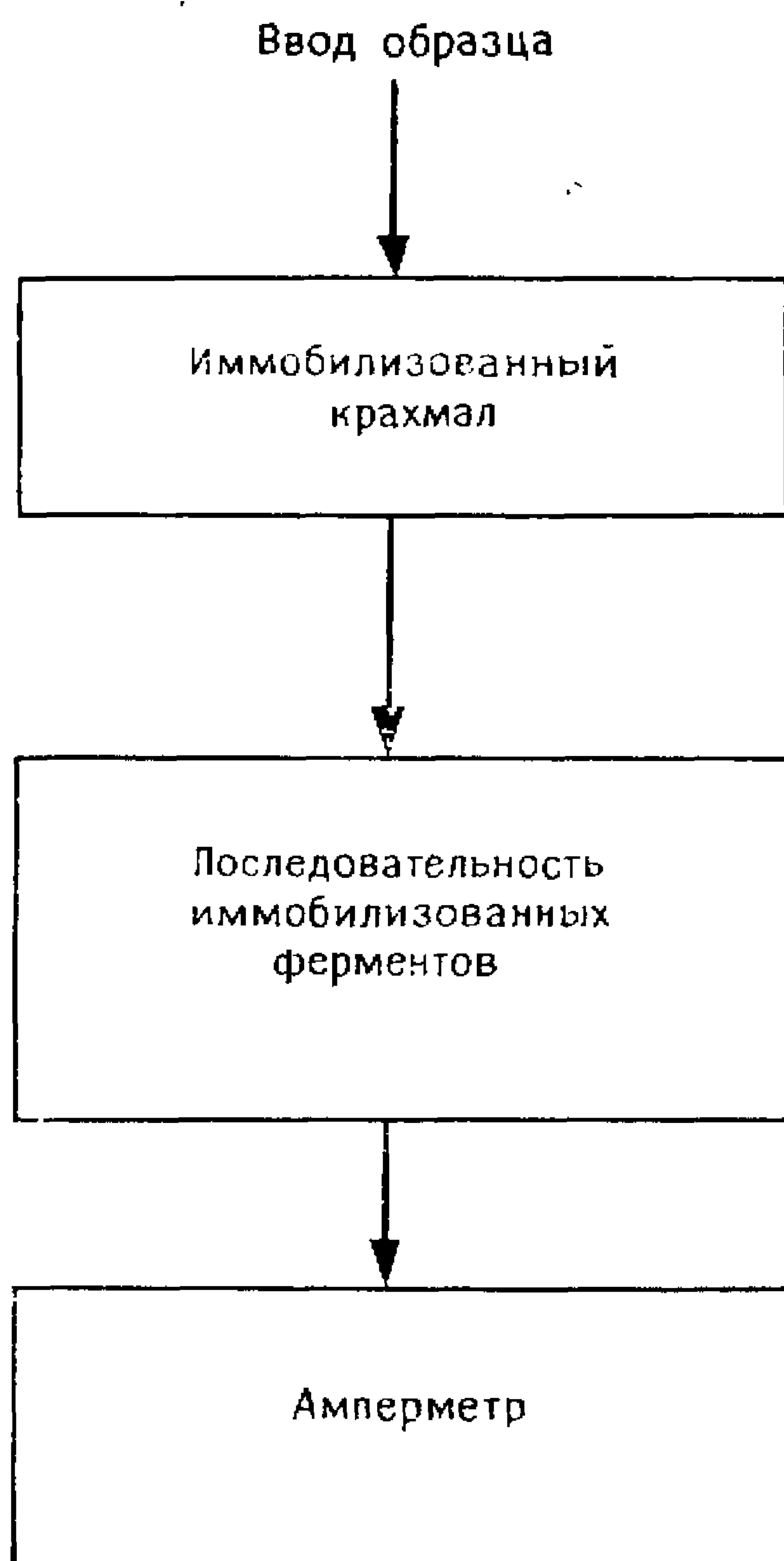


Рис. 11. Схема движения образца в системе для определения α-амилазы.

вергают обработке органическими реагентами, покрывающими силанольные группы, что уменьшает, если не исключает вовсе, ионообменные свойства стекла. Химическая модификация стекла с контролируемым размером пор наиболее часто осуществляется кипячением стеклянных шариков в водных [10% (масс./об.), pH 3,45] или толуольных [10% (масс./об.)] растворах γ-аминопропилтриэтоксисилана.

Другие производные стекла с контролируемым размером пор могут быть получены с использованием в качестве алкилсилана триэтоксипропилглицидоксисилана (Pierce Chemical Company, США).

13. ДИОЛСВЯЗАННЫЙ СИЛИКАГЕЛЬ

Р. Уолтерс (R. R. Walters)

13.1. Введение

Диолсвязанный силикагель (Diol-bonded silica) был использован в качестве носителя в большинстве исследований по высокоэффективной аффинной хроматографии. Хотя такого рода носители коммерчески доступны, они могут быть легко синтезированы из силана и пористого силикагеля, что гораздо дешевле. Схема реакции приведена на рис. 12.

$$-Si-OH + CH_3O-Si(OCH_3)_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-\underset{\diagdown O \diagup}{CH-CH_2}$$

силикагель; 3-глицидоксипропилтриметоксисилан

$$\downarrow$$

$$-Si-O-Si-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH(OH)-CH_2(OH)$$

диолсвязанный силикагель

Рис. 12. Реакции, используемые для превращения силикагеля в диолсвязанный силикагель.

Реакция может быть проведена в безводной или водной среде. В безводной среде получают монослой силана, в то время как реакция в водной среде приводит к полимерному слою. Методика в водной среде проста и обеспечивает лучшее покрытие для силанольных групп, вызывающих денатурацию и неспецифическую адсорбцию. Полимеризованный слой может быть более устойчив также к гидролитическому расщеплению [39].

В литературе описано много методик силанизации в водной среде; однако при попытках синтезировать носители с различной площадью поверхности встречаются затруднения. По-видимому, на конечную концентрацию силана на поверхности носителя оказывают влияние как концентрация силана, так и соотношение количества силана и площади поверхности силикагеля. Эти параметры не могут быть постоянными ввиду широкого различия в площади поверхности силикагелей (табл. 9). Не-

Таблица 9. Степень силанизации различных пористых силикагелей

Размер пор силикагеля, Å	Площадь поверхности, м²/г[a]	Буфер, мл/г силикагеля	Силан, мл/г силикагеля	Концентрация силана, % (об./об.)	Избыток силана[б]	Содержание диола, мкмоль/г	Число монослоев
60	500	15	0,75	5	3,0	910	0,8
80	220	10	0,50	5	4,0	720	1,3
100	250	10	0,50	5	4,0	500	0,9
300	250	10	0,50	5	4,0	520	0,9
500	50	4	0,10	2,5	4,0	190	1,7
1000	20	4	0,05	1,25	4,9	73	1,6
4000	6	5	0,05	1	16	33	2,4

[a] Данные фирмы-производителя.

[б] Отношение использованного количества к необходимому для образования монослоя.

достаточное количество силана не обеспечивает монослойное покрытие силикагеля, в то время как при избытке силана имеет место слипание частиц силикагеля. Поэтому авторы разработали эмпирические методики, которые могут быть использованы для силанизации силикагелей с широким диапазоном площади поверхности.

13.2. Материалы

Используют (3-глицидоксипропил)триметоксисилан, выпускаемый Petrarch Systems (США); силан хранят в эксикаторе. Пригодны силикагели LiChrosorb, LiChrospher и Spherisorb любой фирмы-изготовителя. Ацетат натрия и серная кислота должны иметь продажную степень чистоты. Вся стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта для удаления любой смазки или жира, которые могут адсорбироваться на силикагеле.

13.3. Методы

1) Силикагель и соответствующее количество 0,1 М натрий-ацетатного буфера (pH 5,5; табл. 9) помещают в большую пробирку. Пробирка должна быть достаточно большой, чтобы мож-

но было осторожно перемешивать смесь для образования суспензии силикагеля в буфере.

2) Для удаления пузырьков воздуха из силикагеля суспензию обрабатывают ультразвуком в вакууме водоструйного насоса в течение 2 мин.

3) Добавляют в пробирку соответствующее количество силана (табл. 9).

4) Пробирку закрывают и встряхивают на водяной бане при 90±5 °С в течение 5 ч.

5) Силанизированный силикагель тщательно промывают на стеклянном фильтре со средним диаметром пор сначала водой, а затем водой с H_2SO_4 при pH 3,0 (на этой стадии силикагель содержит как эпоксидные, так и диольные группы).

6) Силикагель переносят в круглодонную колбу, содержащую H_2SO_4 (pH 3,0; ~50 мл/г силикагеля).

7) В колбу помещают также несколько крупных стеклянных шариков, присоединяют обратный холодильник и рубашку для нагревания и кипятят смесь в течение 1 ч для гидролиза оставшихся эпоксидных групп.

8) Диолсвязанный силикагель промывают водой, затем метанолом, сушат в течение ночи при температуре ~70 °С и хранят в эксикаторе.

13.4. Обсуждение

Не следует использовать магнитную мешалку из-за возможного размалывания силикагеля, что неблагоприятно сказывается на эффективности хроматографии.

Для суспендирования силикагеля требуется не менее 4 мл буфера на 1 г силикагеля. Надо брать по крайней мере 4-кратное количество силана относительно теоретического (для образования монослоя силана). Необходимое количество силана можно рассчитать, используя данные фирмы-производителя по площади поверхности силикагеля ($м^2/г$); теоретически для образования монослоя диола необходимо 2,3 $мкмоль/м^2$ [40]; молекулярная масса силана равна 236,3 г/моль; плотность 1,070 г/мл. При концентрации силана менее 2% (об./об.) необходимо использовать больший избыток последнего.

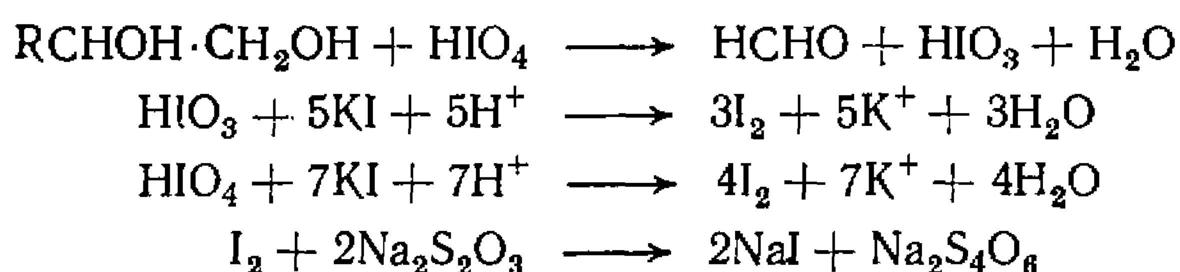
В случае необходимости содержание диола на силикагеле может быть определено с использованием метода периодатного окисления [41].

13.5. Определение содержания диола в диолсвязанном силикагеле методом периодатного окисления

Содержание диольных групп можно определить в соответствии с реакциями, приведенными на рис. 13. Диол окисляют периодной кислотой. Иод, образующийся после добавления иоди-

да калия, титруется тиосульфатом. Необходимо также проведение холостого опыта, поскольку реакция KI как с HIO_3, так и с избытком HIO_4 приводит к образованию иода.

Приведенная модификация периодатного метода [41] удобна для определения диола при содержании <10 мкмоль. Метод может быть применен как для бо́льших, так и для меньших концентраций диола при использовании пропорционально бо́льших или меньших объемов всех реагентов.



$$RCHOH{\cdot}CH_2OH + HIO_4 \longrightarrow HCHO + HIO_3 + H_2O$$
$$HIO_3 + 5KI + 5H^+ \longrightarrow 3I_2 + 5K^+ + 3H_2O$$
$$HIO_4 + 7KI + 7H^+ \longrightarrow 4I_2 + 7K^+ + 4H_2O$$
$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Рис. 13. Реакции, используемые для определения диольных групп в диолсвязанном силикагеле.

13.5.2. Методика. Навеску образца, содержащую 1—8 мкмоль зуют продажные реагенты. Раствор 80%-ной (об./об.) уксусной кислоты в воде можно хранить без ограничений во времени, но другие растворы используют свежеприготовленными: 10%-ный (масс./об.) KI (5,0 г KI в 50 мл воды); 0,02 *М* HIO_4 [0,25 г $HIO_4{\cdot}2H_2O$ в 50 мл 80%-ной (об./об.) уксусной кислоты] и 0,02 *М* тиосульфат натрия [навеска 4,9 г $Na_2S_2O_3{\cdot}5H_2O$ (M=248,18) или 3,1 г $Na_2S_2O_3$ (M=158,11)+0,04 г Na_2CO_3; довести до метки до объема 1 л водой].

13.5.2. Методика. Навеску образца, содержащую 1—8 мкмоль диола, помещают в пробирку объемом 30 мл. Добавляют раствор HIO_4 (0,5 мл).

2) Этот раствор обрабатывают ультразвуком в вакууме водоструйного насоса в течение 30 с для удаления воздуха из пор силикагеля.

3) Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 30 мин, периодически встряхивая пробирку для взмучивания силикагеля.

4) Добавляют раствор KI (0,25 мл) и титруют тиосульфатом (из бюретки на 10 мл) до полного исчезновения желтой

$$\text{Содержание диола (мкмоль)} =$$
$$\text{(объем титранта для холостого опыта—объем титранта для образца)}\times$$
$$\times\text{молярность тиосульфата}\times\frac{1\ \text{л}}{1000\ \text{мл}}\times\frac{1\ \text{моль диола}}{2\ \text{моль тиосульфата}}\times\frac{10^6\ \text{мкмоль}}{\text{моль}}$$

Рис. 14. Расчет концентрации диольных групп. Концентрация диола в образце получается при делении количества (в мкмоль) диола на массу образца (в граммах).

окраски. Перед концом титрования стенки пробирки смывают водой.

5) Проводят холостое титрование раствора, содержащего только растворы HIO_4 и KI.

13.5.3. Расчет. Вначале определяют молярность раствора тиосульфата M_{thio}, затем рассчитывают содержание диольных групп (рис. 14).

13.5.4. Обсуждение. Для проведения анализа можно использовать продажный тиосульфат. Если желательна бо́льшая точность, раствор тиосульфата титруют иодом [41] или готовят раствор тиосульфата из фиксанала [42].

Объем титранта, пошедшего на титрование, должен составлять менее $^2/_3$ объема холостого опыта; если соотношение этих объемов равно $^3/_4$, то это означает, что вся HIO_4 была израсходована.

Когда различие между объемом титранта для холостого раствора и образца небольшое, очень важно провести несколько повторных определений как холостого раствора, так и образца.

Литература

1. *Nicolaisen F. M., Meyland I., Schaumburg K.*, Acta Chem. Scand., **B34(2)**, 103 (1980).
2. *Porath J.*, Biochimie, **55**, 943 (1973).
3. *Hjerten S.*, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
4. *Determann H., Rehner H., Wieland T.*, Makromol. Chem., **114**, 263 (1968).
5. *Determann H., Wieland T.*, Swedish Patent, No. 382 066 (1976).
6. *Chitumbo K., Brown W.*, J. Polym. Sci., **C36**, 279 (1971).
7. *Edlund O. H., Andreassen B. A.*, German Offen., No. 2 138 905 (1972).
8. *Andreassen B. A.*, Swedish Patent, No 343 306 (1972).
9. *Andreassen B. A.*, Swedish Patent, No. 382 329 (1976).
10. *Brown W., Chitumbo K.*, Chemica Scripta, **2**, 88 (1972).
11. *Satake T., Kano I., Tsutsui Y., Yokota K.*, Japanese Kokai Patent, No. 74 91 977 (1974).
12. *Satake T., Hata K.*, Japanese Kokai Patent, No 75 151 289 (1975).
13. *Chandler B. V., Johnson R. L.*, German Offen, No 2 507 551 (1975).
14. *Chen L. F., Tsao G. T.*, Biotechnol. Bioeng., **18**, 1507 (1976).
15. *Peska J., Stamberg J., Blace Z.*, Czech. Patent, No 172640 (1976), German Offen No. 2 523 893 (1975).
16. *Motozato Y.*, Japanese Kokai Patent, No 78 07 759 and 78 86 749 (1978).
17. *Kuga S.*, J. Chromatogr., **195**, 221 (1980).
18. *Stamberg J., Peska J., Paul D., Philipp B.*, Acta Polymerica **30**, 734 (1979).
19. *Mislovicova D., Gemeiner P., Kuniak L., Zemek J.*, J. Chromatogr., **194**, 95 (1980).
20. *Hey Y.*, Ph. D. Thesis, Liverpool University (1983).
21. *Cruft H. J.*, Biochim. Biophys. Acta, **54**, 609 (1961).
22. *Inman J. K., Dintzis H. M.*, Biochemistry (Wash.), **8**, 4074 (1969).
23. *Wichterle O., Lim D.*, Nature, **185**, 117 (1960).
24. *Coupek J., Labsky J., Kalal J., Turkova J., Valentova O.*, Biochim. Biophys. Acta, **481**, 289 (1977).

25. *Manecke G., Vogt H.-G.*, J. Solid-phase Biochem., **4**, 233 (1979).
26. *Kay G., Crook E. M.*, Nature, **216**, 514 (1967).
27. *Keyes M. H., Barabino R. C.*, in: Enzyme Engineering, Vol. 3, Pye E. K., Weetall H. H. (eds), Plenum Publishing Corporation, New York, 1978, p. 51.
28. *Gray D. N., Keyes M. H.*, Chem. Tech., **7**, 642 (1977).
29. *Watson B., Keyes M. H.*, Anal. Lett., **9**, 713 (1976).
30. *Axen R., Porath J., Ernback S.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
31. *Keyes M. H.*, US Patent, No. 3 933 589 (1976).
32. *Richards F. M., Knowles J. R.*, J. Mol. Biol., **37**, 231 (1968).
33. *Keyes M. H.*, US Patent, No. 4001 085 (1977).
34. *Caldwell C. G., White T. A., George W. L., Eberl J. J.*, US Patent, No. 2 626 257 (1953).
35. *Barabino R. C., Gray D. N., Keyes M. H.* Clin. Chem., **24**, 1393 (1978).
36. *Barabino R. C., Keyes M. H.*, US Patent, No 4 217 415 (1980).
37. *Meites S., Rogols S.*, Clin. Chem., **14**, 1176 (1968).
38. *Regnier F. E., Noel R.*, J. Chromatogr. Sci., **14**, 316 (1976).
39. *Watson M. W.*, Ph. D. Dissertation, University of Minnesota (1981).
40. *Becker N., Unger K. K.*, Chromatographia, **12**, 539 (1976).
41. *Siggia S., Hanna J. G.*, Quantitative Organic Analysis, published by Wiley, New York, 1979, p. 42.
42. *Wolf A. A.*, Anal. Chem., **54**, 2134 (1982).

Глава 2.

МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ

1. БРОМОЦИАН

1.1. Присоединение вставок к матрицам

Бромоциан взаимодействует с вицинальными диольными группами агарозы*, декстранов и целлюлозы с образованием реакционноспособной матрицы, которая может быть затем модифицирована путем присоединения вставок или лигандов, содержащих первичные аминогруппы. Такой метод активации сорбента до настоящего времени был одним из наиболее широко применяемых из всех методов иммобилизации (рис. 1). Однако две особенности указанной реакции явились причиной интенсивного поиска других методов активации: 1) CNBr-активация однозначно приводит к биоселективному адсорбенту с анионообменными свойствами, обусловленными образованием заряженных изомочевинных групп, и 2) возникающие при активации производные изомочевины могут подвергаться нуклеофильной атаке, т. е. носитель теряет устойчивость.

Изомочевинная группа, образующаяся при реакции с первичным амином, положительно заряжена при физиологических значениях pH ($pK_a \sim 9,5$). Если алкильная группа, присоединенная к изомочевинной группе, обладает сильной гидрофобностью, то вокруг изомочевинных групп диэлектрическая проницаемость очень понижена, что приводит к значительному рассредоточению заряда по всей поверхности геля.

Кроме того, CNBr-активированные матрицы недостаточно устойчивы во времени; поэтому реакция присоединения должна быть проведена немедленно после активации. Наблюдается довольно значительное отщепление присоединенного лиганда от CNBr-активированных носителей, особенно в присутствии буферов, содержащих амины, но вопреки широко распространенному мнению можно использовать трис-буфер, так как аминогруппа триса стерически сильно экранирована. Например, трис не реагирует с нингидрином и с трудом ацилируется по аминогруппе в обычных условиях [1].

---

* В отличие от декстрана и целлюлозы агароза содержит ограниченное число вицинальных гидроксильных групп, которые расположены на концах агарозных цепей. Подробнее о реакции CNBr с агарозными носителями см. [*Kohn J., Wilchek M.*, Appl. Biochem. Biotechnol., **9**, 285 (1984)].— *Прим. перев.*

Несмотря на указанные ограничения, бромоцианактивированная агароза тем не менее широко и успешно применяется в синтезе многих аффинных абсорбентов. Поскольку использование бромоциана в химической практике небезопасно (например, при подкислении растворов может выделяться HCN), широкое применение нашла продажная активированная бромоцианом

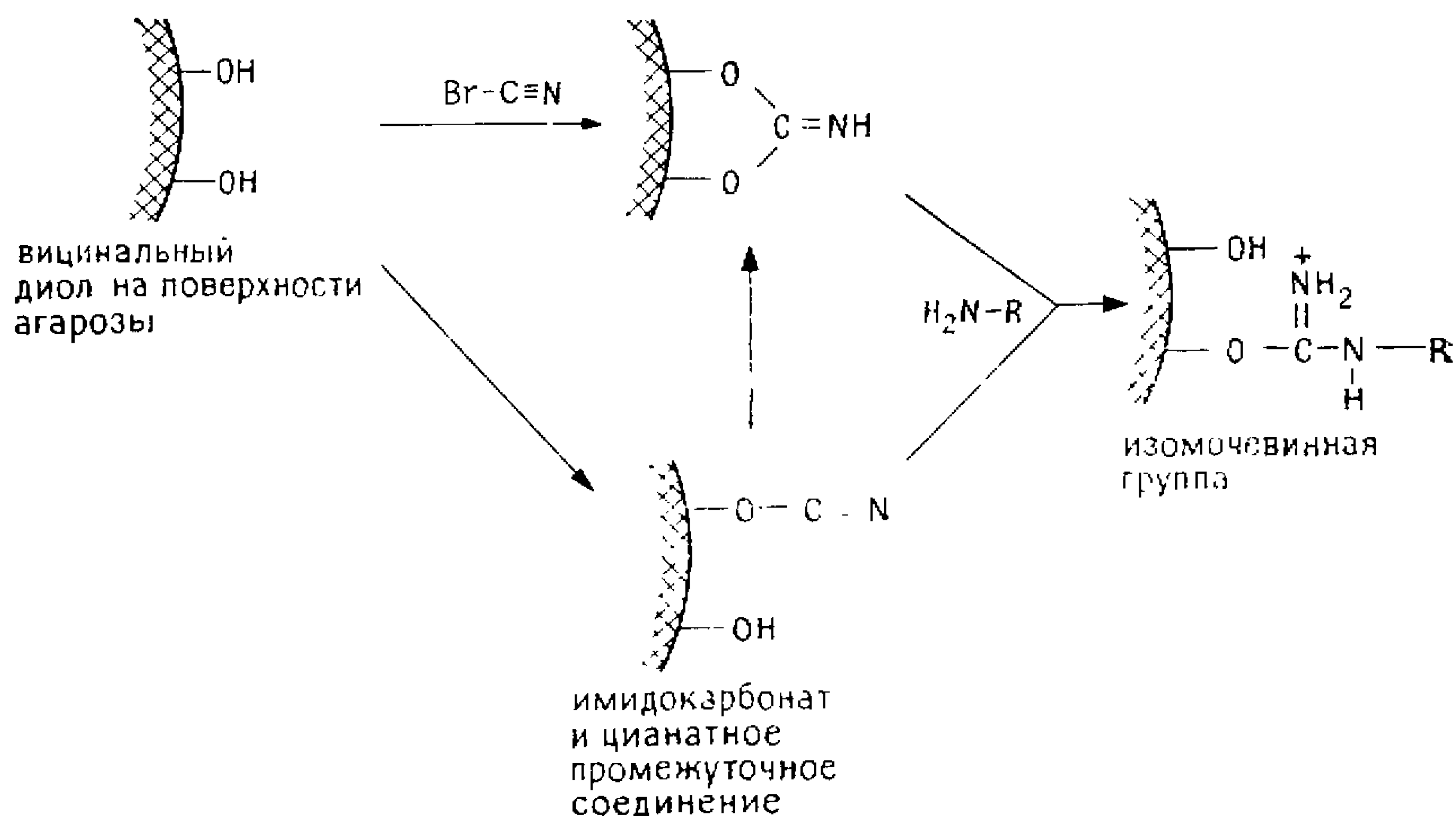


Рис. 1. Бромоцианактивация полисахаридов.

агароза. Однако для некоторых целей предпочтительнее активировать агарозу в лаборатории непосредственно перед использованием.

1.2. Метод активации с титрованием

Внимание! Всю работу необходимо проводить только в хорошо работающем вытяжном шкафу.

1) В стакан на 100 мл с 20 мл дистиллированной воды добавляют хорошо промытые влажные агарозные шарики (20 г). Температуру реакционной смеси в стакане контролируют термометром (0÷100 °C), а pH среды — pH-метром; для перемешивания используют магнитную мешалку (причем для предотвращения измельчения и разрушения шариков магнитик магнитной мешалки должен иметь центральный выступ; при отсутствии такого магнитика можно по центру стержня одевать 1-миллиметровую полоску тефлона или полиэтилена).

2) Суспензию медленно перемешивают, при необходимости добавляют измельченный лед (для поддержания температуры 10—15 °C) и доводят pH до 10,8±0,1 с помощью 4,0 М NaOH (1—2 капли).

3) Процесс активации начинают с действия CNBr при pH 10,8±0,1 (поддерживается добавлением 4,0 NaOH из бюретки). CNBr (100 мг/г влажного геля) может вводиться в измельченном твердом виде, а также в виде раствора в ацетонитриле (1 г/мл). Такой раствор можно хранить в герметично закрытой склянке, находящейся в вертикальном положении внутри другого контейнера с винтовой пробкой при —20 °C.

4) Температуру реакционной смеси повышают до 18—20 °C. Окончание реакции соответствует моменту установления постоянного значения pH реакционной смеси, так что добавление щелочи уже не требуется.

5) По окончании стадии активации гель быстро охлаждают путем добавления измельченного льда. (*Осторожно!* Очень часто для получения промышленного льда используется водопроводная вода. Кроме того, лед может быть загрязнен маслами. Поэтому перед применением необходимо проверить небольшое количество льда и использовать на этой стадии только чистый лед.) Реакционную смесь переносят на большую воронку с пористым стеклянным фильтром, предварительно охлажденную измельченным льдом.

6) Активированный носитель отделяют фильтрованием с помощью колбы Бюхнера (2 л), в которую для удаления непрореагировавшего CNBr и цианидов в виде нетоксичного ферроцианида наливают раствор сульфата железа(II) (для разложения CNBr вполне подходит также 3—4 *M* NaOH; он удобен при активации небольших количеств носителя).

7) Гель промывают (с отсасыванием) ледяной дистиллированной водой (1 л) и буфером (1 л), используемым на стадии присоединения.

1.3. Стадия присоединения

Большинство непротонированных первичных аминов (трис составляет исключение; см. гл. 2, разд. 1.1) эффективно присоединяются к CNBr-активированной агарозе и декстрану с образованием продуктов, структура которых показана на рис. 1. Образование N-замещенных производных изомочевины или иминокарбонатов зависит от используемого носителя. Присоединение должно проводиться при $pH > pK_a$ лиганда (однако $pH < 10$). Так, для ароматических аминов следует использовать pH 7÷8 ($pK_a \sim 5$), для аминокислот pH 9,5÷10 (pK_a α-$NH_2 \sim 8$) и для алифатических аминов pH 10 ($pK_a \sim$ $\sim 9 \div 10$). В реакции присоединения не следует применять буферы, содержащие аминогруппы (при необходимости можно использовать трис [1]), так как аминогруппы буфера конкурируют с аминогруппами лиганда в реакции с активированными группами матрицы. В этих реакциях удобны боратные или

карбонатные буферы. Эффективность присоединения снижается при pH>9,5÷10,0 (рис. 2), поскольку в этих условиях устойчивость активированного комплекса резко уменьшается. CNBr-активированная сефароза также нестабильна при повышенных температурах, и реакцию присоединения обычно проводят при 4 °C.

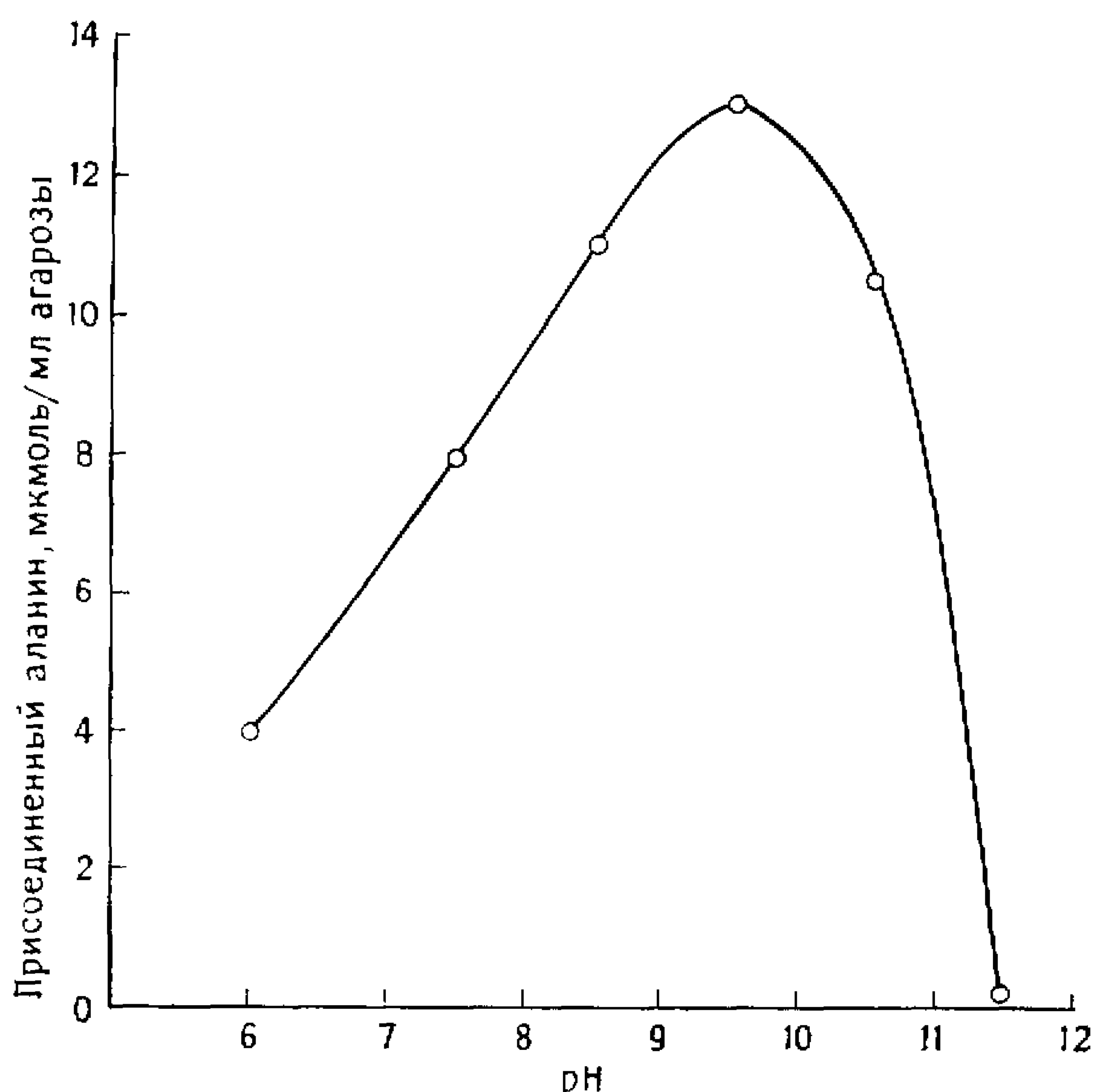


Рис. 2. Влияние pH на присоединение [^{14}C]-аланина к CNBr-активированной агарозе [2]. (Воспроизведено с разрешения.)

1.4. Другой метод активации [3]

1) Агарозу (10 г) промывают фосфатным буфером (25 мл) и путем фильтрования удаляют основные количества воды.

2) Агарозу переносят в пробирку, содержащую буфер в количестве, указанном в табл. 1.

3) Медленно добавляют бромоциан в указанных количествах и осторожно встряхивают смесь в течение 10 мин при 5 °C.

4) По окончании реакции продукт собирают на пористом стеклянном фильтре и промывают ледяной дистиллированной водой до нейтральной реакции фильтрата.

5) К активированной агарозе должен быть немедленно присоединен соответствующий лиганд или вставка.

6) Для присоединения к матрице лигандов или вставок, содержащих свободные первичные аминогруппы, 20 мл CNBr-ак-

тивированной агарозы (или то же количество продажной CNBr-активированной агарозы, подготовленной в соответствии с указаниями фирмы-производителя) промывают 0,25 М раствором $NaHCO_3$ (50 мл).

7) К промытой CNBr-активированной агарозе добавляют 0,25 М раствор $NaHCO_3$ (20 мл), содержащий растворенный лиганд или вставку (50—500 мг).

Таблица 1. CNBr-активированная агароза

Степень модификации[a]	Концентрация агарозы в геле, % (масс./об.)	Объем буфера, мл	Объем водного раствора CNBr, мл
Высокая (~300 ммоль/г)	4	10	4
	6	15	6
Умеренная (140 ммоль/г)	4	0,8	0,8
	6	1,2	1,2
Слабая (100 ммоль/г)	4	0,6	0,2
	6	0,7	0,3

[a] К поперечно-сшитой агарозе (например, сефарозе CL) присоединяется только 25—30% количества лиганда, присоединенного к обычной агарозе.

8) Реакционную смесь осторожно встряхивают или перемешивают при 0—4 °С в течение ночи.

Для обеспечения модификации всех активированных гидроксильных групп агарозы непрореагировавшие цианаты могут быть блокированы встряхиванием шариков с 1,0 М глицином (pH 8,0) в течение 6—12 ч при 0 °С.

2. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА АКТИВАЦИИ ОКСИРАНАМИ

2.1. Введение

Бисоксираны, такие, как диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (рис. 3), при щелочных pH легко взаимодействуют с гидрокси- и аминосодержащими гелями с образованием производных с иммобилизованным через длинную гидрофильную вставку реакционноспособным оксираном (эпоксидом), который в

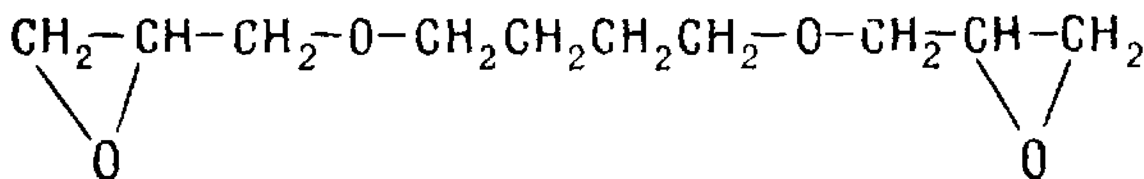


Рис. 3. Диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола.

свою очередь может реагировать с нуклеофильными лигандами (аминами, фенолами и т. д.); при этом образуются биоселективные адсорбенты, характеризующиеся минимальным содержанием гидрофобных и ионных групп. Лиганды, присоединенные к оксирановым группам, широко используются и чрезвычайно устойчивы, а применение длинноцепочечного бисоксиранового реагента обеспечивает введение длинной гидрофильной вставки между лигандом и поверхностью матрицы, что в некоторых случаях может быть полезным.

Эпоксидактивированная сефароза поставляется фирмой Pharmacia, а оксиран-акриловые шарики (эупергит С) — фирмой Rohm Pharma (гл. 1, табл. 3).

2.2. Оксирановая активация агарозы

1) Шарики агарозы (10 г) тщательно промывают дистиллированной водой; избыток воды удаляют фильтрованием через пористый стеклянный фильтр.

2) Промытый гель суспендируют в 1,0 М NaOH (5 мл), добавляют 5 мл диглицидилового эфира 1,4-бутандиола; смесь осторожно встряхивают (или перемешивают) в течение 5—10 ч при комнатной температуре.

3) Активированный гель тщательно промывают дистиллированной водой и хранят при 4 °С.

Поскольку содержание оксирановых групп при хранении медленно уменьшается, активированный гель надо использовать по возможности быстрее. Сообщалось, что при соблюдении вышеуказанных рекомендаций уменьшения содержания реакционноспособных групп не происходит (или происходит в незначительной степени) в течение недели и даже более того [4]; однако в присутствии щелочи разложение оксирана ускоряется.

Гели с различным содержанием оксирановых групп могут быть получены при разной продолжительности реакции или при введении разного количества бисоксирана. К оксиранактивированной агарозе могут легко присоедняться амины, гидроксилы и другие нуклеофилы.

2.2.1. Присоединение к оксиранактивированной агарозе.

1) Оксиранактивированную агарозу (3 г) суспендируют в 0,2 М Na_2CO_3 (2 мл; pH 11), содержащем амин (1,58 ммоля).

2) Смесь оставляют при 4 °С в течение 15 ч и затем промывают 1,0 М NaCl.

3) Для удаления избытка эпоксида гель выдерживают в течение 1 недели в Na_2CO_3-буфере (pH 11÷12) или подвергают длительной обработке концентрированным гидроксиламином при нейтральном pH. Предлагается также гораздо более кратковременная обработка оксиранактивированной агарозы (4—

6 ч при pH 7,5) меркаптанами (2-меркаптоэтанолом, этандитиолом или тиомочевиной), которая приводит к полному удалению избыточных реакционноспособных эпоксидных групп.

В процессе присоединения следует исключить присутствие цистеина, тиосульфата и тиогликолевой кислоты, так как в противном случае продукт содержит ионные группы.

2.2.2. Рекомендованная фирмой Pharmacia методика присоединения к эпоксиактивированной сефарозе 6В.

1) Берут навеску эпоксиактивированной сефарозы 6В.

2) Взятую навеску промывают и оставляют для набухания в дистиллированной воде на пористом стеклянном фильтре.

3) Готовят раствор лиганда.

4) Раствор лиганда перемешивают (используя качалку) с суспензией геля в течение 16 ч при 25—40 °С (водяная баня). Не следует применять магнитную мешалку.

5) Избыток лиганда отмывают, используя раствор для присоединения, затем промывают дистиллированной водой, 0,1 *М* бикарбонатным буфером (pH 8,0) и в заключение 0,1 *М* ацетатным буфером (pH 4,0).

6) Избыточные группы блокируют путем обработки 1,0 *М* этаноламином в течение ночи.

7) Избыток этаноламина отмывают и хранят продукт при 4—8 °С.

2.2.3. Замечания.

1) *Раствор для присоединения.* По возможности надо использовать дистиллированную воду или водные буферные растворы. Нельзя применять глициновые или другие нуклеофильные буферы, так как они могут реагировать с оксирановыми группами. Вполне подходят хорошо оправдавшие себя карбонатный, боратный или фосфатный буферы. Для доведения pH растворов до высоких значений можно использовать раствор гидроксида натрия.

Лиганд должен быть предварительно растворен в буфере для присоединения. Для полного растворения лиганда можно добавлять некоторые органические растворители, например диметилформамид и диоксан вплоть до концентрации 50% (об./об.) в конечной смеси. При необходимости pH водной фазы должен быть доведен до нужного значения после растворения лиганда. Органические растворители обычно вызывают понижение pH; следует использовать pH-индикаторную бумагу, так как органические растворители могут повредить электроды.

2) *Зависимость от pH.* Присоединение проводится в интервале pH 9÷13. Использование максимального pH ограничивается стабильностью лиганда и углеводных цепей матрицы. Устойчивость оксирановых групп также зависит от pH.

3) *Зависимость от температуры.* Присоединение проводят в температурном интервале 20—45 °С (водяная баня) предпочтительно с использованием качалки. Нельзя применять прямое нагревание и магнитные мешалки. При работе при более высоких температурах время реакции может быть сокращено; гели механически устойчивы при высоких температурах, поэтому при проведении элюирования можно использовать температуры вплоть до 100 °С.

4) *Время реакции.* Время реакции сильно зависит от pH раствора для присоединения, свойств лиганда и температуры проведения реакции присоединения. Эффективность присоединения также зависит от pH и температуры; наиболее часто реакцию присоединения проводят при 20—45 °С в течение 16 ч.

3. N-ГИДРОКСИСУКЦИНИЛАМИДОСУКЦИНИЛ-АГАРОЗА

И. Мацумото (I. Matsumoto)

Эпоксиактивированная агароза при обработке растворами аммиака может быть превращена в аминопроизводные, которые с помощью янтарного ангидрида могут быть затем сукцинилированы и активированы N-гидроксисукцинимидом.

3.1. Аминирование эпоксиактивированной агарозы до амино-агарозы

1) Эпоксиактивированную агарозу тщательно промывают дистиллированной водой на пористом стеклянном фильтре и суспендируют в концентрированном растворе аммиака (1,5 объема).

2) Суспензию выдерживают при 40 °С в течение 1,5 ч при встряхивании, затем переносят на пористый стеклянный фильтр и промывают гель дистиллированной водой.

3.2. Получение N-гидроксисукцинимидного эфира агарозы

1) Амино-агарозу промывают 0,1 *М* NaCl и суспендируют в 0,1 *М* NaCl (1,5 объема).

2) Постепенно небольшими порциями добавляют измельченный янтарный ангидрид (0,08 г/г влажной амино-агарозы).

3) Добавлением 20% (масс./об.) NaOH поддерживают в суспензии pH 6.

4) После установления постоянного значения pH (без дополнительного добавления NaOH) суспензию выдерживают в течение 5 ч.

5) Для удаления лабильных карбоксильных групп промытую сукцинилированную агарозу инкубируют с 0,1 *М* NaOH в течение 30 мин при комнатной температуре.

3.3. Активация сукциниламино-агарозы N-гидроксисукцинимидом

1) Сукциниламино-агарозу промывают большим количеством диоксана до обезвоживания и готовят суспензию в диоксане (3 объема).

2) К суспензии при постоянном перемешивании добавляют твердый гидроксисукцинимид и дициклогексилкарбодиимид до конечной концентрации 0,1 моль/л по каждому реагенту.

3) Реакционную смесь оставляют на 70 мин, затем гель промывают диоксаном (8 объемов), метанолом (4 объема) (для удаления осадка дициклогексилмочевины) и диоксаном (3 объема).

3.4. Присоединение гемагглютинина из *Lens culinaris* к активированной агарозе

1) Влажную активированную сефарозу 4B (20 г) на пористом стеклянном фильтре быстро промывают водой (50 мл) и затем немедленно переносят в стакан, в котором находится лектин (100 мг), растворенный в смеси состава 0,9% NaCl+ +0,01 *M* $NaHCO_3$ (pH 7,5; 100 мл)+0,1 *M* метил-α-D-маннозид.

2) Суспензию оставляют в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем в течение ночи при 4 °C.

3) Для блокирования оставшихся реакционноспособных групп гель инкубируют с 0,1 *M* триэтаноламин-HCl-буфером (pH 9,0) в течение 1 ч при комнатной температуре.

4. ТРИАЗИНОВАЯ АКТИВАЦИЯ АГАРОЗЫ

К. Лонгстаф (C. Longstaff)

1) Поперечно-сшитую агарозу (1 объем) промывают на пористом стеклянном фильтре дистиллированной водой (5 объемов) и затем 12%-ным (масс./об.) раствором NaOH (5 объемов).

2) После стекания NaOH под действием силы тяжести гель переносят в 12%-ный (масс./об.) раствор NaOH (1 объем).

3) Суспензию охлаждают в бане (лед+соль) до +5 °C (±1 °C).

4) Готовят 0,5 *M* раствор трихлоро-*симм*-триазина (для удаления циануровой кислоты перекристаллизованного один раз из кипящего хлороформа) в ацетоне; раствор охлаждают до —5 °C (лед+соль).

5) Приготовленный раствор (2 объема) осторожно приливают к суспензии геля (1 объем) таким образом, чтобы образовалось два слоя.

6) При охлаждении реакционной смеси льдом с солью начинают медленное перемешивание на магнитной мешалке (магнитик должен иметь по центру выступ). Слои постепенно смешиваются, перемешивание продолжают еще 100 мин до полного исчезновения расслаивания.

7) В течение всего периода перемешивания надо контролировать температуру внутри реакционной смеси и охлаждать реакционную колбу льдом.

8) После установления требуемой температуры лед можно убрать и продолжать перемешивание при комнатной температуре.

Таблица 2. Влияние концентрации NaOH на триазиновую активацию (количество гександиамина, присоединенного к активированному гелю, определялось с помощью нингидриновой реакции)

Концентрация NaOH, % (масс./об.)	Время, мин	Количество присоединенного гександиамина, мкмоль/мг геля
10	90	0,92
15	130	0,68
17	130	0,64
20	120	0,46

Таблица 3. Влияние концентрации трихлоро-*симм*-триазина на триазиновую активацию агарозы (количество этилендиамина, присоединенного к активированному гелю, определялось с помощью нингидриновой реакции)

Концентрация трихлоро-*симм*-триазина, моль/л	Количество присоединенного этилендиамина, мкмоль/мг геля
0,3	0,23
0,15	0,17
0,075	0,04

9) Активированный гель промывают 50%-ным (об./об.) ацетоном (5 объемов) и затем водой (5 объемов).

Триазинактивированный гель может храниться в течение нескольких недель в дистиллированной воде при 4 °С без заметной потери активности. Присоединение проводят при умеренно щелочных рН, например в 0,5 М калийфосфатном буфере (рН 7,8).

4.1. Замечания

Степень активации уменьшается при использовании более высокой концентрации NaOH (до 20% (масс./об.)) (табл. 2) или меньшей концентрации трихлоро-*симм*-триазина (табл. 3).

4.2. Присоединение этилендиамина или алифатического диамина к триазинактивированной агарозе

Готовят суспензию влажного активированного геля (2 г) в воде (2 мл). Добавляют 1 М этилендиамин (4 мл) и осторожно перемешивают не менее 2 ч в течение ночи при комнатной тем-

пературе. Степень активации можно определить с помощью нингидринового реагента.

4.3. Триазиновая активация фильтровальной бумаги

1) Фильтровальную бумагу (20×20 см) замачивают в 3,0 М NaOH на 1,5 ч.

2) Осторожно вынимают бумагу и дают стечь избытку NaOH.

3) Бумагу помещают в резервуар, куда добавляют 0,5 М раствор трихлоро-*симм*-триазина в ацетоне (1 л).

4) Всю систему оставляют на 1—3 ч, периодически перемешивая. В ходе активации образуется осадок и бумага может деформироваться.

5) Активированную бумагу промывают 50%-ным (об./об.) ацетоном (1 л) в течение 15 мин и затем водой (1 л) также в течение 15 мин.

4.4. Присоединение *м*-аминофенилборной кислоты к триазинактивированной бумаге

1) Промытую активированную бумагу помещают в 0,5 М калийфосфатный буфер (pH 7,8), содержащий *м*-аминофенилборную кислоту (1 г/л), и оставляют на 24 ч.

2) Для удаления избытка реакционноспособных групп бумагу погружают в 0,5 М этаноламин на 24 ч.

3) Затем бумагу вынимают, промывают 5%-ной (об./об.) уксусной кислотой и 1,0 М KCl и дают высохнуть в течение ночи.

5. АКТИВАЦИЯ АГАРОЗЫ 2,4,6-ТРИФТОРО-5-ХЛОРОПИРИМИДИНОМ

Т. Грибнау (T. C. J. Gribnau)

5.1. Методические указания

Реакции проводят в трехгорлой круглодонной колбе объемом 100 мл с охлаждающей рубашкой (рис. 4). Внутренняя поверхность колбы должна быть предварительно силиконизирована; для этого тщательно вымытую колбу ополаскивают хлороформным раствором специального состава*; после испарения хлороформа колбу нагревают в течение 30 мин при 300 °C. Для приготовления суспензии агарозы в реакционной среде используется мешалка Vibro-Mixer (Chemap A. G., Швейцария).

* Торговое название растворенного вещества Dow-Corning 200 Fluid 350 CS; берется 5%-ный (масс./об.) раствор этого вещества в хлороформе.

5.1.1. Методика А.

1) Готовят суспензию сефарозы 4В (25 г отфильтрованного геля) в 3,0 NaOH (50 мл); колбу с суспензией медленно вращают в течение 15 мин при комнатной температуре. Полученную «щелочную сефарозу» отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре; жидкость удаляют путем отсасывания (водоструйный насос).

2) Подготовленный материал суспендируют в 40 мл ксилол-диоксановой смеси (1 : 1, масс./масс.), для чего используют ме-

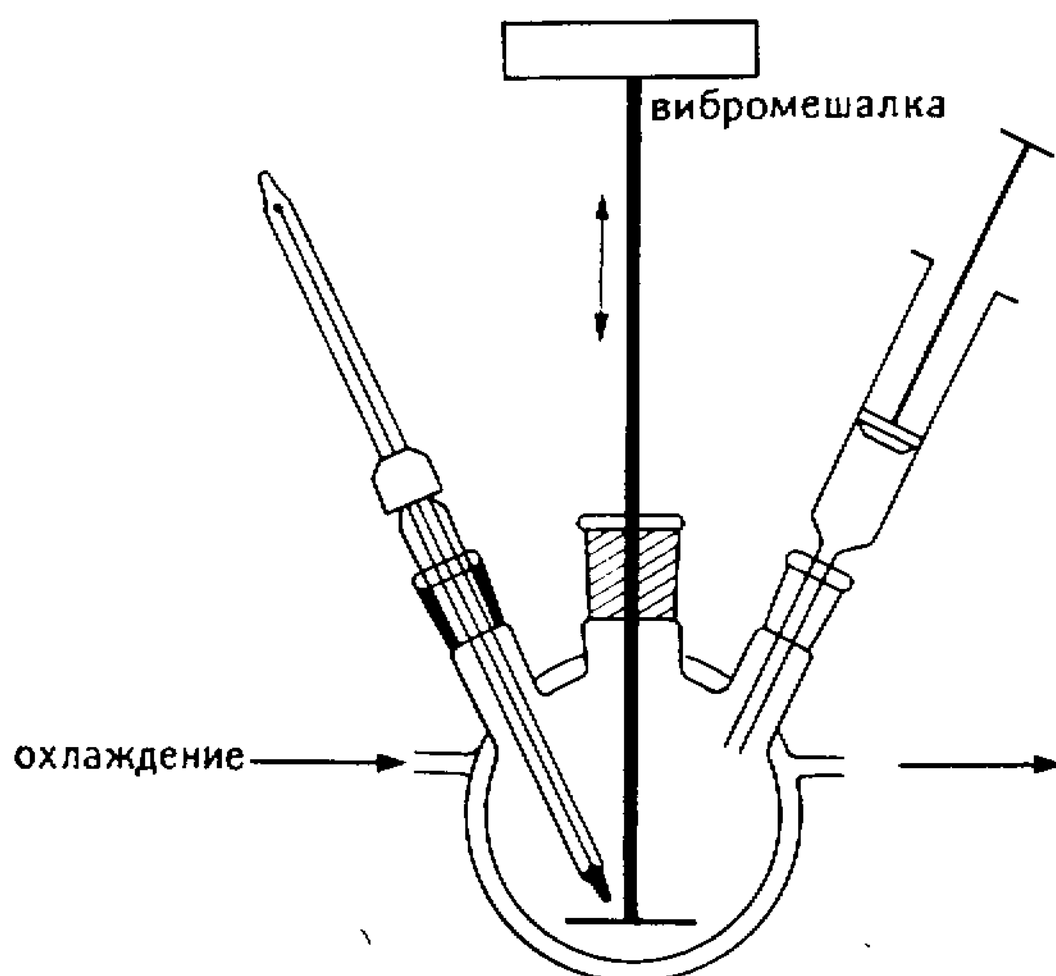


Рис. 4. Прибор для ФХП-активации агарозы.

шалку Vibro-Mixer (при максимальной скорости); суспензию охлаждают до 0 °С.

3) Раствор 2,4,6-трифторо-5-хлоропиримидина (ФХП) (4—5 г, 2,5—3,0 мл) в ксилол-диоксановой смеси (1 : 1, масс./масс.) (4 мл) добавляют по каплям к приготовленной суспензии, следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 0,5 °С; эта операция занимает около 1 ч.

4) Для прекращения реакции добавляют концентрированную уксусную кислоту (4,2 мл).

5) Активированную агарозу отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре и промывают ксилол-диоксановой смесью (200 мл), диоксаном (200 мл) и в заключение водой (1 л). Хранят гель при 4 °С.

В отличие от исходной сефарозы 4В ФХП-агароза не растворяется в воде при температуре выше 40 °С. Аликвоту геля промывают ацетоном, удаляют жидкость отсасыванием в вакууме водоструйного насоса и сушат в вакууме над концентриро-

ванной серной кислотой. Содержание N, F и Cl определяют элементным анализом. Некоторые аналитические данные представлены в табл. 4.

5.1.2. Методика Б.

1) «Щелочной сефарозой 4B» (~25 г, отфильтрованный гель), полученной по методике А (разд. 5.1.1, п. 1), наполняют пластмассовый шприц (20 мл), игла которого заменена тефлоновой трубкой (длина 7 см, внутренний диаметр 3 мм). Собирают прибор, как показано на рис. 4.

Таблица 4. Типичные результаты нескольких элементных анализов ФХП-активированных агарозных шариков, полученных по методике А

Партия	Содержание, %		
	N	F	Cl
а	4,6	2,9	5,9
б	4,7	2,8	5,7
в	4,6	2,9	6,0

Таблица 5. Типичные результаты нескольких элементных анализов ФХП-активированных агарозных шариков, полученных по методике Б

Партия	Содержание, %		
	N	F	Cl
г	5,8	5,3	6,5
д	5,7	5,4	6,6
е	5,7	5,05	6,4

2) Сефарозу прибавляют к ксилол-диоксановому раствору (1 : 1, масс./масс.) ФХП (4—5 г ФХП в 40 мл раствора), предварительно охлажденному до 0 °С; прибавление сефарозы ведут с такой скоростью, чтобы температура не повышалась выше 4 °С. Операция занимает ~25 мин.

3) Реакционную смесь оставляют еще на 15 мин при 0 °С, а затем добавляют концентрированную уксусную кислоту (4,2 мл).

4) Отделяют ФХП-агарозу, как описано в методике А (разд. 5.1.1, п. 5).

Некоторые аналитические данные представлены в табл. 5.

5.1.3. Методика В.

1) Сефарозу 4B (~25 г, отфильтрованный гель) промывают раствором NaOH или Na_2CO_3 (250 мл) (табл. 6); жидкость удаляют отсасыванием на пористом стеклянном фильтре (водоструйный насос).

2) «Щелочной сефарозой» наполняют пластмассовый шприц, как описано в методике Б (разд. 5.1.2, п. 1).

3) Все количество щелочной сефарозы в одну порцию вводят в 40 мл ксилол-диоксанового (1 : 1, масс./масс.) раствора ФХП, предварительно охлажденного до —10 °С. При этом температура может повыситься до +9 °С, но затем при хорошем охлаждении довольно быстро падает.

4) Реакцию проводят в течение 15 мин при +3 °С, затем добавляют небольшой избыток уксусной кислоты (~4,2 мл).

5) Активированную ФХП-агарозу отделяют, как описано в методике А (разд. 5.1.1, п. 5).

5.2. Присоединение гексаметилендиамина к ФХП-агарозе

1) Отделяют жидкость от ФХП-активированной сефарозы 4В отсасыванием на пористом стеклянном фильтре (водоструйный насос), гель суспендируют в водном растворе гексаметилендиамина (ГМДА); суспензию медленно вращают в течение 15—20 ч при комнатной температуре.

Таблица 6. Типичные результаты нескольких элементных анализов ФХП-активированных агарозных шариков, полученных по методике В

Партия	Раствор, используемый для получения «щелочной сефарозы»	Количество ФХП, введенного в реакцию, г	Содержание, %		
			N	F	Cl
ж	3,00 М NaOH	1,07	0,8	0,6	1,0
з	0,27 М NaOH	1,07	1,7	1,3	1,9
и	0,10 М NaOH	1,00	0,9	0,9	1,15
к	0,27 М Na_2CO_3 (pH 11,4)	1,03	0,6	0,5	0,55
л	1,32 М NaOH	5,06	4,2	4,0	4,7

2) Продукт отфильтровывают, тщательно промывают бидистиллированной водой, 0,05 М HCl (2 объема геля), бидистиллированной водой, 0,1 М NaOH (5 объемов геля) и вновь бидистиллированной водой до нейтральной реакции элюата. Качественный контроль на присутствие первичных аминогрупп можно провести с помощью нингидринового реагента.

3) Аликвоту ГМДА-сефарозы промывают метанолом, жидкость удаляют путем отсасывания и сушат гель в вакууме.

Содержание N, F и Cl определяется элементным анализом.

5.3. Присоединение анилина к ФХП-агарозе

1) Активируют сефарозу 4В (23 г, отфильтрованный гель), как описано в разд. 5.1.1 (методика А).

2) Активированный продукт суспендируют в растворе, содержащем анилин (1,74 г), 0,07 М фосфатный буфер (pH 7,0; 25 мл) и диоксан (10 мл, не содержащий пероксидов).

3) Суспензию вращают в течение 26 ч при комнатной температуре.

4) Продукт отфильтровывают, промывают водно-диоксановой смесью (2,5 : 1) (об./об.) и водой.

5) Аликвоту промывают ацетоном, жидкость удаляют путем отсасывания и сушат в вакууме. Содержание N, F и Cl определяют элементным анализом.

6) Выделение продукта проводят, как описано для ГМДА-агарозы (разд. 5.2, п. 3).

5.4. Присоединение имидазола к ФХП-агарозе

1) ФХП-сефарозу 4В (5 г, отфильтрованный гель) промывают 0,2 М боратным буфером (pH 9,0; 50 мл) и суспендируют в 0,5 М растворе имидазола (5 мл) в том же буфере; суспензию вращают в течение 17 ч при комнатной температуре.

2) Продукт отфильтровывают, промывают водой, 0,1 М HCl, водой, 0,1 М NaOH и бидистиллированной водой.

3) Аликвоту промывают метанолом, жидкость удаляют путем отсасывания и сушат в вакууме.

Содержание N, F и Cl определяют элементным анализом.

5.5. Присоединение этантиола к ФХП-агарозе

1) ФХП-агарозу 4В (2 г влажного геля) суспендируют в растворе, содержащем этантиол (1 мл), 0,2 М боратный буфер (pH 9,2; 5,2 мл) и этанол (7 мл).

2) Суспензию вращают в течение 21 ч при комнатной температуре.

3) Продукт отфильтровывают и тщательно промывают водно-этанольным (1 : 1, об./об.) раствором, этанолом и в заключение ацетоном.

5.6. Присоединение глицилглицина/*п*-аминобензамидина к ФХП-агарозе (биоспецифический адсорбент для трипсина)

1) ФХП-сефарозу 4В (11 г отфильтрованного геля; партия к — см. табл. 6) суспендируют в растворе, содержащем глицилглицин (0,74 г) в 5 мл буфера (pH 10,6—0,5 М Na_2CO_3/$NaHCO_3$).

2) Суспензию вращают в течение 27 ч при комнатной температуре.

3) Продукт отфильтровывают, промывают бидистиллированной водой (250 мл).

4) Отфильтрованный гель суспендируют в растворе дихлорогидрата *п*-аминобензамидина (1,25 г, 6 ммоль) в бидистиллированной воде.

5) Доводят pH суспензии до 5,0 и добавляют хлорогидрат 1-(3-диметиламинопропил)3-этилкарбодиимида (1,15 г, 6 ммоль).

6) Реакцию проводят при pH 5,0 в течение 2 ч при комнатной температуре.

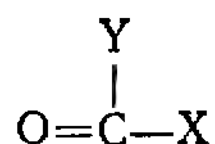
7) Продукт отфильтровывают, промывают бидистиллированной водой, 0,5 М NaCl (100 мл) и вновь бидистиллированной водой (250 мл).

8) Хранят гель в 0,05%-ном (масс./об.) растворе NaN_3 при 4 °C.

По данным элементного анализа адсорбент содержал 108 мкмоль лиганда на 1 г сухого геля.

6. КАРБОНИЛДИИМИДАЗОЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ

Полисахаридные матрицы могут активироваться с использованием карбонилирующих агентов общей формулы:



где Y — группа, легко замещаемая амином, а X — та же группа, что и Y, или другая подходящая также замещаемая группа, которая связывается с атомом водорода в процессе карбонилирования. Карбонилирующими реагентами могут служить N,N′-карбонилдиимидазол (КДИ), N,N′-карбонилди-1,2,3-бензотриазол (КБТ) или N,N′-карбонилди-1,2,4-триазол (КДТ).

6.1. Активация сефарозы CL 6B карбонилдиимидазолом

1) Сефарозу CL 6B (3 г влажного геля) последовательно промывают (по 50 мл) водой, водно-диоксановой смесью [(3 : 7) (об./об.), затем (7 : 3) (об./об.)], диоксаном и суспендируют в диоксане (5 мл).

2) Добавляют КДИ (0,12 г). Реакционную смесь из сефарозы и КДИ можно оставить на 0,25—6 ч в зависимости от времени проведения последующих стадий промывания и присоединения, причем выходы реакции идентичны в указанных интервалах времени. Это отличает данный метод активации от CNBr-метода, при котором необходимо проводить стадию присоединения как можно быстрее. Кроме того, степень активации можно значительно увеличить при использовании большего количества КДИ.

3) После активации носитель промывают диоксаном (100 мл) и используют немедленно.

6.2. Присоединение лигандов к активированным матрицам

Обрабатывают активированную матрицу в течение ночи *н*-бутиламином (1,4 г) в воде (9 мл) при pH 10 и последовательно промывают водой (200 мл), 1,0 М NaCl (100 мл) и водой (200 мл). По стоимости и емкости КДТ- и КБТ-активиро-

ванные матрицы по сравнению с КДИ-матрицами не обладают, по-видимому, какими-либо преимуществами, кроме большей скорости присоединения. КДИ-активация сравнима в какой-то мере с распространенным CNBr-методом, но более удобна в экспериментальном отношении.

Одно из наиболее значительных преимуществ методов, основанных на применении карбонилирующих реагентов, по сравнению с CNBr-методом заключается в том, что в ходе стадии присоединения на матрицу не вводятся заряженные группы.

6.3. Рекомендованный метод для применения коммерчески доступной КДИ-активированной агарозы

КДИ-активированная 6%-ная поперечно-сшитая агароза производится фирмой Pierce Chemical Company под торговым названием «реактигель» (6X) [Reacti-Gel (6X)]. Этот продукт представляет собой 6%-ную поперечно-сшитую сферическую агарозу, модифицированную КДИ с образованием высокоактивированной имидазолилкарбаматной матрицы.

6.3.1. Методика присоединения. Присоединение белков осуществляется главным образом через доступные α- и ε-аминогруппы. Белки могут быть присоединены непосредственно путем многоточечного связывания с носителем или с использованием вставки. Для белков, лабильных при pH$\geqslant$9, реакцию присоединения можно проводить при pH 8,5 в 0,1 М боратном буфере. Если и эти условия непригодны для белка, то присоединение можно осуществить через вставку в присутствии водорастворимого карбодиимида (pH 4,5÷5,5; 24 ч; комнатная температура).

1) Избыток ацетона из реактигеля (6X) удаляют путем осторожного отсасывания на пористом стеклянном фильтре. При этом ацетон не должен больше капать с влажного остатка, но не следует высушивать гель полностью.

2) Влажный реактигель (6X) измельчают.

3) Добавляют гель в буфер, содержащий лиганд.

4) Для белков, чувствительных к небольшим количествам ацетона, перед использованием гель отмывают от растворителя путем быстрого промывания требуемого количества геля несколькими объемами ледяной воды.

Бычий тиреоглобулин, бычий тиреоидстимулирующий гормон, инсулин свиньи и человеческий иммуноглобулин могут быть успешно присоединены к реактигелю (6X) с 87—100%-ным выходом и, как было показано, сохраняют свою биологическую активность в указанных условиях присоединения.

Выпускается также КДИ-активированный поперечно-сшитый декстран-реактигель (25DF) в виде шариков (фирма-производитель Pierce Chemical Company).

7. АКТИВАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ

Приведенная ниже методика применяется в первую очередь для активации лиганда, а не матрицы (разд. 7.1). В разд. 7.2 аналогичная химическая методика применена для карбоксилированных матриц, которые можно модифицировать в безводных условиях (например, карбокси-эупергит С, который может быть получен обработкой эупергита С глицином).

7.1. Получение 17β-эстрадиол-6-(0-карбоксиметил)оксима — БСА

1) 17β-эстрадиол-6-(О-карбоксиметил)оксим (180 мг) и три-*н*-бутиламин (0,22 мл) растворяют в сухом диоксане (7,5 мл); раствор охлаждают во льду.

2) К этой смеси добавляют изобутилхлорокарбонат (55 мкл) и оставляют реакционную смесь на 30 мин, поддерживая температуру <10 °С.

3) Добавляют раствор БСА (0,58 г) в щелочном водно-диоксановом растворе (15,3 мл воды+10,3 мл диоксана+0,58 мл 1,0 М NaOH); реакцию продолжают в течение 4 ч при 5—10 °С, поддерживая рН 8,0 с помощью NaOH.

4) Низкомолекулярные вещества из реакционной смеси удаляют, пропуская реакционную смесь через колонку с сефадексом G-25 (30×2,5 см), предварительно уравновешенную 0,9% (масс./об.) раствором NaCl, при элюировании также раствором NaCl (того же состава).

5) Очищенный конъюгат подкисляют разбавленной HCl до рН 4,6 и оставляют на 4 дня при 4 °С.

6) Образовавшийся осадок отделяют с помощью центрифугирования; отделенный осадок вновь суспендируют в небольшом объеме воды и переводят в раствор путем добавления необходимого количества твердого $NaHCO_3$.

7) Раствор лиофилизируют.

7.2. Получение изохлорокарбонатактивированных матриц

1) Карбоксилированную матрицу сушат над P_2O_5.

2) 1 г высушенной матрицы помещают в сухую предварительно взвешенную ампулу.

3) Матрицу суспендируют в сухом диоксане (5 мл) и добавляют три-*н*-бутиламин (1 мл).

4) Реакционную смесь оставляют на 10 мин, затем матрицу промывают сухим диоксаном (10 мл).

5) Охлаждают до 0 °С, добавляют изобутилхлорокарбонат (2 мл) и оставляют на 30 мин, поддерживая температуру <10 °С.

6) Матрицу быстро промывают сухим диоксаном (20 мл), водно-диоксановой смесью (1 : 1, 50 мл) и водой (50 мл).

7) Добавляют раствор присоединяемого аминосоединения (содержащего 50—200 мкмоль аминогрупп) в буфере [pH 8,0; могут применяться фосфат — NaOH или боратный буферы (0,02÷0,2 М)].

8) Для удаления несвязавшегося лиганда адсорбент промывают и определяют концентрацию лиганда либо по количеству несвязавшегося лиганда, либо по данным химического анализа матрицы.

8. ПЕРИОДАТНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Полисахаридные матрицы могут быть активированы окислением вицинальных диольных групп метапериодатом натрия $NaIO_4$, который переводит указанные диольные группы сахаров в альдегидные. В отличие от CNBr-активирования метод периодатного окисления более быстрый и удобный. Метапериодат натрия растворим в водной среде и поэтому может быть легко удален после реакции промыванием. Активированный гель может храниться при 4 °С в течение многих дней без заметной потери активности. Введенные таким образом в матрицу альдегидные группы реагируют с большинством первичных аминов при значениях pH 4÷6 с образованием шиффовых оснований, которые далее могут быть стабилизированы восстановлением борогидридом $NaBH_4$, или, что более предпочтительно, цианоборогидридом ($NaBH_3CN$).

1) Гель смешивают с равным объемом 0,2 М $NaIO_4$.

2) Помещают в плотно закрытый полиэтиленовый сосуд и осторожно встряхивают на механической качалке в течение 2 ч при комнатной температуре.

3) Периодатокисленную матрицу отфильтровывают и тщательно промывают дистиллированной водой на пористом стеклянном фильтре.

8.1. Получение аминогексил-агарозы

8.1.1. Методика А.

1) Окисленную периодатом агарозу (100 мл) добавляют к 2,0 М водному раствору гександиамина (100 мл) при pH 5 и осторожно встряхивают в течение 6—10 ч при 20 °С.

2) Повышают pH до 9,0 путем добавления твердого Na_2CO_3, затем небольшими порциями вносят свежеприготовленный водный раствор $NaBH_4$ (10 мл) при 4 °С за 12 ч при осторожном перемешивании.

3) Восстановленный гель промывают 1,0 М NaCl до отсутствия амина в фильтрате.

8.1.2. Методика Б.

1) Смешивают равные объемы окисленной периодатом агарозы, предварительно промытой 0,5 *М* фосфатным буфером (рН 6,0), 25 м*М* раствора аминсодержащего лиганда в 0,5 *М* фосфатном буфере (рН 6,0) и 0,5 м*М* раствора $NaBH_3CN$; реакционную смесь оставляют на 3 дня при комнатной температуре.

2) Гель промывают и восстанавливают оставшиеся альдегидные группы путем добавления равного объема 1,0 *М* $NaBH_4$ в течение 15 ч при 4 °С.

3) Перед использованием гель тщательно промывают дистиллированной водой.

8.2. Периодатная активация целлюлозы

1) Используя мешалку роторного или переворачивающего (end-over-end) типа, целлюлозные шарики или волокнистую целлюлозу (10 г) перемешивают с 0,5 *М* метапериодатом натрия (1 л) при комнатной температуре в течение 2 ч; добавляют этиленгликоль (30 мл) и продолжают перемешивание еще 1 ч.

2) Целлюлозу отфильтровывают и промывают водой (1 л).

3) Промытый гель суспендируют в равном объеме воды.

4) К суспензии добавляют ~30 ммоль адипоилдигидразида, растворенного в минимальном объеме воды, и доводят рН реакционной смеси до 5,0 с помощью HCl.

5) Перемешивание продолжают еще в течение 1 ч, после чего доводят рН до 9 твердым карбонатом натрия.

6) Добавляют борогидрид натрия (1 г), перемешивают и оставляют на 12 ч в открытой колбе при 4 °С (*Осторожно!* Выделяется газообразный водород!).

7) Целлюлозу отфильтровывают и промывают 0,1 *М* уксусной кислотой (200 мл), а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции фильтрата.

8.3. Получение иммуноадсорбентов с очень низким неспецифическим связыванием с использованием окисленной периодатом поперечно-сшитой сефарозы

Э. Фишер (E. A. Fischer)

Неспецифическое связывание с матрицей часто является серьезной проблемой в иммуноадсорбции компонентов сыворотки не только из-за снижения степени очистки, но также ввиду уменьшения достигаемого выхода. Этот эффект особенно проявляется при использовании бромцианактивированной агарозы. Определенные классы IgG жестко связываются с такими гелями. Это связывание не зависит от метода, примененного

для инактивации непрореагировавших групп геля. При сравнении модифицированных различными методами углеводных матриц было обнаружено, что неспецифическое связывание вызывается использованием методов активации, при которых в матрицу вводятся заряженные группы [5]. Активация бромцианом приводит к образованию заряженных изомочевинных групп; получаемые при этом методе сорбенты обладают рядом недостатков. Существенное улучшение свойств сорбентов было обнаружено при работе с матрицами аффигелевого типа (Affi-Gel), в которых активированные эфиры карбоновых кислот присоединяются к агарозной матрице простыми эфирными связями. Единственный недостаток этих матриц, однако, заключается в легком гидролизе активных групп, что может приводить к очень низкому выходу на стадии присоединения.

Ранее был описан активированный периодатом сефадекс (G-50 или G-75) [6]. После присоединения иммуноглобулина и восстановления шиффовых оснований полученные иммуноадсорбенты характеризовались очень низким неспецифическим связыванием, но гели оказались механически весьма неустойчивыми и быстро забивались. Кроме того, гели имели очень низкую емкость, потому что антитела исключались из внутреннего объеме шариков. Хотя агароза имеет больший размер пор, этот гель активируется периодатным окислением в незначительной степени, так как реакция протекает только по концам цепей полисахаридных молекул. Однако периодатным окислением может быть активирована поперечно-сшитая агароза. В результате побочной реакции, сопровождающей процесс поперечной сшивки с эпихлорогидрином, на геле образуются гликоли. Периодатное окисление этих гликолей приводит к альдегидам, которые могут реагировать с аминогруппами белка. Образовавшиеся шиффовы основания могут быть далее восстановлены, как описано для других матриц. Иммуносорбенты, полученные таким путем, характеризуются очень хорошими хроматографическими свойствами, сочетая жесткость агарозных шариков с химической стабильностью и низким неспецифическим связыванием. Могут быть достигнуты высокие скорости потока даже при использовании таких хаотропных агентов, как 6,0 М солянокислый гуанидин [7].

8.4. Присоединение антител и антигенов к окисленной с помощью периодата сефарозе CL 6B

8.4.1. Предварительная обработка геля.

1) Сефарозу CL 6B промывают на пористом стеклянном фильтре дистиллированной водой (5—10 объемов).

2) Удаляют бо́льшую часть воды, удерживаемой гелем.

3) 35 г сефарозы помещают в полиэтиленовую колбу объемом 200 мл.

4) Добавляют 0,07 М раствор периодата натрия (70 мл) в воде и медленно перемешивают реакционную смесь в течение 45 мин при комнатной температуре.

5) Добавляют 2,0 М раствор этиленгликоля и продолжают перемешивание еще 30 мин.

6) Гель отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре и промывают водой, а затем 0,01 М натрийбикарбонатным буфером (рН 9,5).

7) Рассчитанное количество геля вносят в раствор присоединяемого белка.

8.4.2. Приготовление растворов белков для присоединения. Белки растворяют в буфере, содержащем 20 ммоль/л фосфата и 0,13 моль/л хлорида натрия (рН 7,4). Добавляют 0,2 М раствор карбоната натрия до концентрации 0,01 моль/л и доводят рН до 9,5 с помощью NaOH. Концентрация белка должна быть в интервале 5—30 мг/мл.

8.4.3. Присоединение белков к активированному гелю.

1) Активированную сефарозу (1÷1,5 г) прибавляют к раствору белка (1 мл), полученному, как описано выше; при этом суспензия должна оставаться не очень густой и легко перемешиваемой.

2) Реакцию продолжают в течение 48 ч, медленно вращая колбу при 4—8 °С.

3) Непрореагировавший белок удаляют с геля путем фильтрования и промывания ледяным буфером, в котором готовился раствор белка (рН 7,4; см. разд. 8.4.2).

4) Жидкость, удерживаемую между частицами геля, отжимают.

5) Для восстановления шиффового основания и оставшихся альдегидных групп добавляют свежеприготовленный раствор борогидрида натрия, содержащего 1 мг $NaBH_4$ на 1 мл того же буфера (2 мл/г геля).

6) Реакцию продолжают при медленном перемешивании в течение 1 ч в холодном помещении.

7) Гель промывают буфером (рН 7,4), затем хаотропным агентом, используемым в последующем эксперименте по иммуноадсорбции.

8) После тщательного промывания буфером (рН 7,4) гель готов к применению.

8.4.4. Определение выхода на стадии присоединения (щелочной гидролиз и реакция с нингидрином).

1) После обработки хаотропным агентом и тщательного промывания фосфатным буфером (рН 7,4) берут две навески

(по 300 мг) геля (после удаления большей части жидкости, удерживаемой гелем) в одинаковые аналитические пробирки.

2) К навескам добавляют тот же буфер (0,1 мл) и 1,0 *М* NaOH (3 мл).

3) Смесь оставляют при 37 °С в течение 20 ч, поддерживая шарики геля в суспендированном состоянии встряхиванием.

4) Проводят несколько контрольных опытов с немодифицированной сефарозой, для чего к навескам сефарозы добавляют одни и те же объемы растворов белка (по 0,1 мл раствора) в буфере с pH 7,4 (обычно бычьего сывороточного альбумина), содержащие разные количества белка (например, 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 и 2,0 мг).

5) После гидролиза в каждый образец добавляют ледяную уксусную кислоту (0,22 мл); из каждой пробирки берут аликвоту (1 мл) и прибавляют свежеприготовленный нингидриновый реагент (1 мл). Для приготовления нингидринового реагента растворяют нингидрин (2 г) и гидриндантоин (0,15 г) в метилцеллозольве (75 мл) и добавляют 4,0 *М* натрийацетатный буфер (pH 5,5; 25 мл) [8, 9].

6) Все образцы разбавляют этанолом (2 мл) для получения прозрачного раствора и измеряют оптическую плотность при 570 нм.

8.4.5. Пример А. Сефароза CL 6B с иммобилизованными антителами барана против человеческого Fc. Активированный гель (13 г) прибавляют к раствору антител барана против человеческого Fc (10 мл), содержащему 10,7 мг белка/мл. Реакцию продолжают в течение 48 ч при 2—8 °С. Полученный гель содержит 4,2 мг белка на 1 г влажного геля.

8.4.6. Пример Б. Сефароза CL 6B с иммобилизованным $F(ab')_2$ человека. Активированный гель (12 г) прибавляют к полученному обработкой пепсином фрагменту $F(ab')_2$IgG человека (10 мл), содержащему 5,4 мг белка/мл. Реакцию продолжают в течение 48 ч при 2—8 °С. Полученный гель содержит 4,2 мг белка на 1 г влажного геля.

8.4.7. Пример В. Сефароза CL 6B с иммобилизованным IgG человека.

1) Активированный гель (57 г) промывают буфером для присоединения с высокой ионной силой (0,1 *М* фосфат, содержащий 1,0 *М* NaCl и 0,01 *М* карбонат; pH 9,5).

2) Добавляют раствор IgG человека (50 мл), содержащий 10 мг белка/мл в том же буфере (фракция II IgG человека, фирма Fluca AG, Швейцария).

3) Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 16 ч.

4) Гель обрабатывают, как описано выше. Полученный гель содержит 5,5 мг белка на 1 г влажного геля.

8.4.8. Пример Г. Сефароза CL 6B с иммобилизованным человеческим альбумином. Активированный гель (19,5 г) прибавляют к 15 мл раствора человеческого альбумина (15 мг/мл) в 0,01 М карбонате натрия (pH 9,5); pH доводят с помощью NaOH. Реакцию проводят в течение 48 ч при 2—8 °C и обрабатывают, как описано выше. Полученный гель содержит 12,5 мг белка на 1 г влажного геля.

9. ПОЛИИЗОЦИАНАТНАЯ АКТИВАЦИЯ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРОВ

Г. Кризам (G. Krisam)

9.1. Некоторые сведения об используемых матрицах

9.1.1. Сферическая целлюлоза. Целлюлоза в форме сферических гранул (Институт макромолекулярной химии, Прага, ЧССР) может быть получена в следующих интервалах по размеру: 20—60, 40—100, 100—200, 200—500 и 500—2000 мкм. Благодаря наличию высокоструктурированных участков обеспечивается высокая механическая прочность матрицы даже в отсутствие поперечной сшивки. Пористость составляет 80—90% с размерами пор 10—60 нм, 10—20% пор имеют размер больше, чем 60 нм. Процесс получения достаточно прост и включает стадии, представленные на рис. 5.

9.1.2. Полигидроксимодифицированное стекло с контролируемым размером пор (Serva, ФРГ). Стекло с контролируемым размером пор представляет собой сферические частицы с диаметром 100—200 мкм. Размеры пор 40—80 нм. Благодаря полигидрокси-покрытию носитель является гидрофильным и электронейтральным. Кислотные группы стекла блокированы, и неспецифическое взаимодействие с белками весьма незначительно.

9.2. Методика активации на примере сферической целлюлозы

1) Для дегидратации шариков целлюлозы (предпочтительно диаметром 200—500 мкм) их обрабатывают органическим растворителем (например, ацетоном или метанолом).

2) Добавляют катализатор.

3) Растворитель удаляют и шарики обрабатывают полиизоцианатом.

4) Шарики промывают органическим растворителем, сушат в вакууме и хранят в запаянных стеклянных ампулах.

Активированные шарики целлюлозы чрезвычайно устойчивы. Продукт может храниться в течение 3 недель в открытом стеклянном сосуде без заметной потери связывающей емкости.



Рис. 5. Получение сферической целлюлозы.

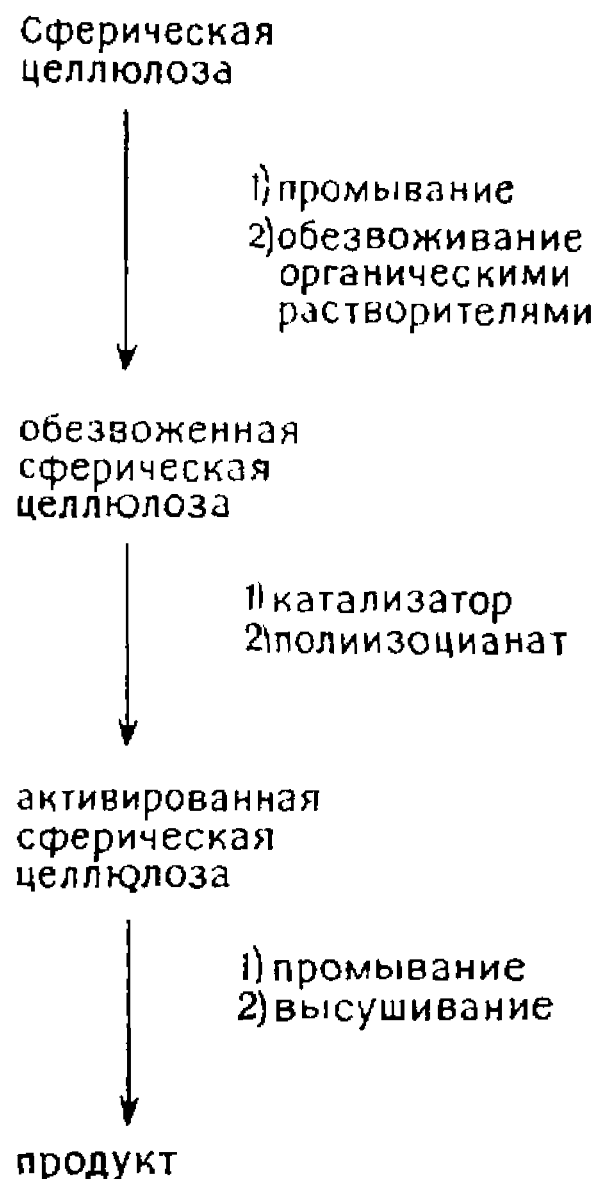


Рис. 6. Получение полиизоцианатактивированной сферической целлюлозы.

Если продукт хранится в стеклянных банках с завинчивающейся пробкой, то связывающая емкость не уменьшается в течение более одного года. Процесс активации представлен на рис. 6.

9.3. Методика присоединения

Присоединение белков и лигандов к активированной матрице осуществляется довольно просто (рис. 7).

Сухую предварительно активированную матрицу промывают 0,1 М HCl, затем переносят ее в раствор белка в соответствующем буфере. Изоцианатные группы реагируют с аминогруппами белка. Реакционную смесь перемешивают в течение 2—3 ч при комнатной температуре, затем продукт промывают. В случае альбумина реакция завершается за 3 ч (рис. 8).

9.4. Сравнение с другими методами присоединения

Благодаря полимерным вставкам и мягким условиям реакции при использовании полиизоцианатной активации достигаются высокие выходы и незначительная потеря ферментативной активности. Иммобилизованная уреаза сохраняет высокую активность; степень присоединения прямо пропорциональна кон-

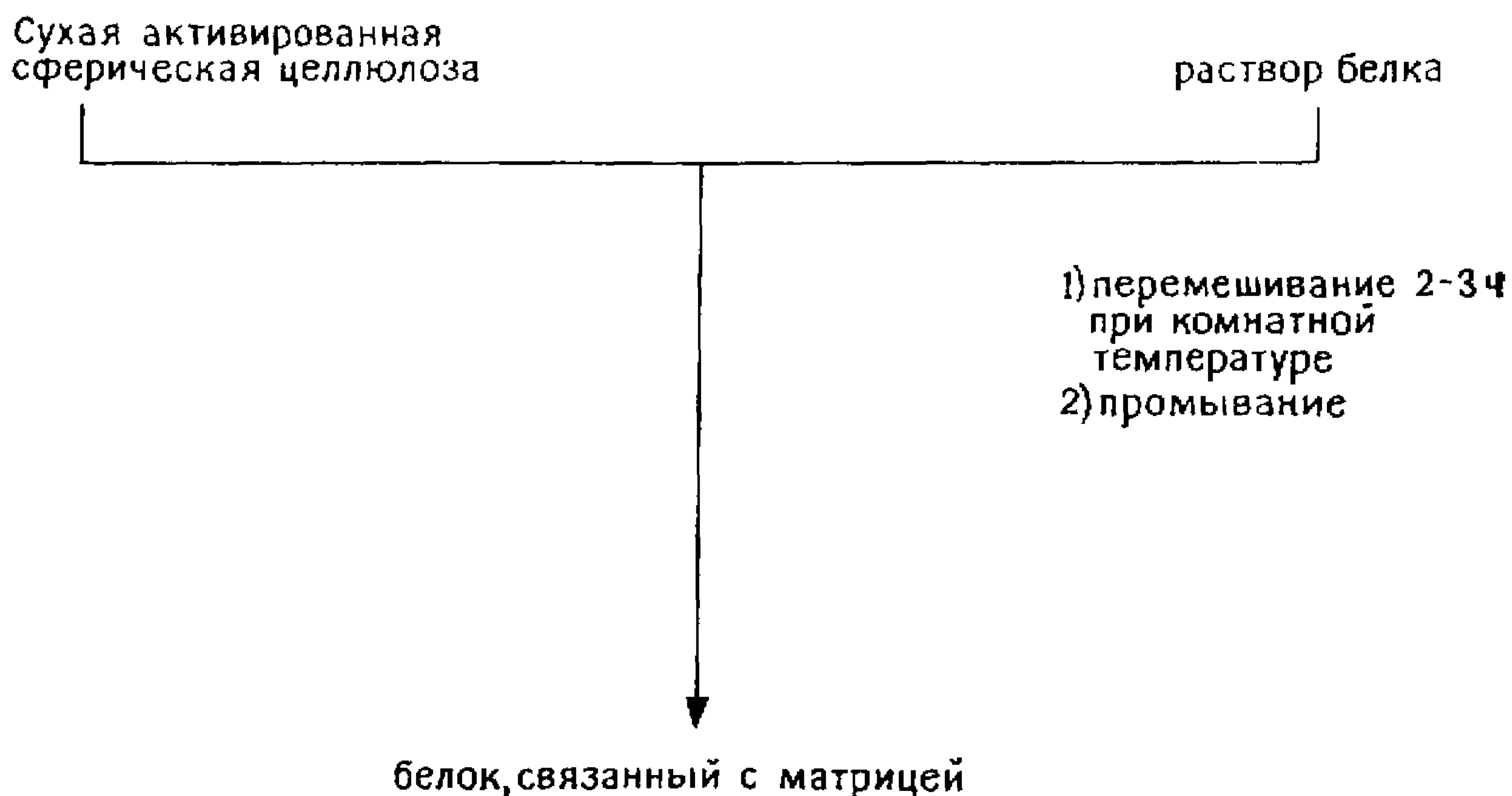


Рис. 7. Присоединение альбумина к полиизоцианатактивированной сферической целлюлозе.

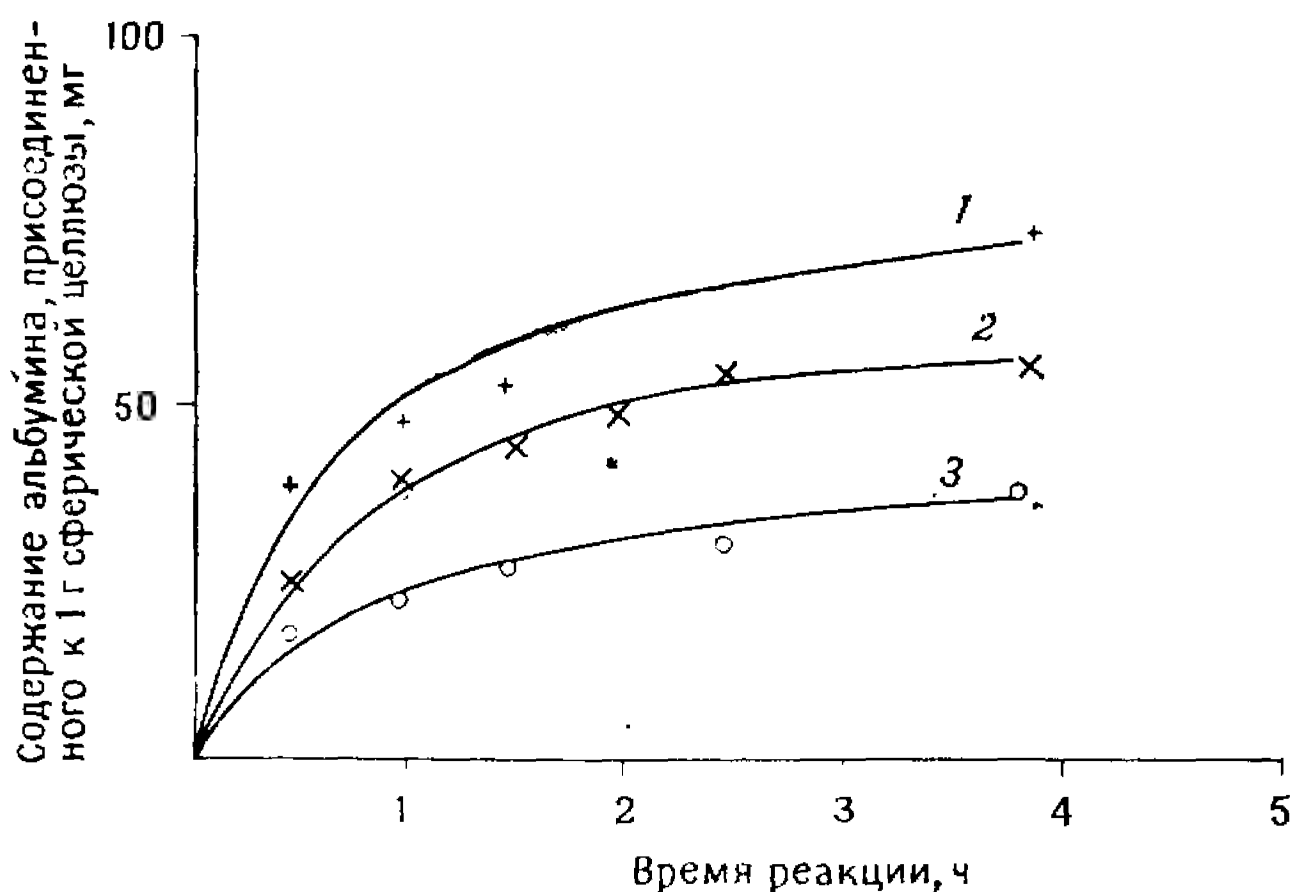


Рис. 8. Зависимость реакции альбумина с полиизоцианатактивированной сферической целлюлозой от времени. Предварительно активированную полиизоцианатом сферическую целлюлозу (1 г) промывали 0,1 М HCl и добавляли к растворам с тремя различными концентрациями альбумина из сыворотки быка. Через указанные промежутки отбирали аликвоты и определяли концентрацию альбумина. Содержание альбумина (мг) в 100 мл раствора: *1* — 26,4; *2* — 16,9; *3* — 8,6.

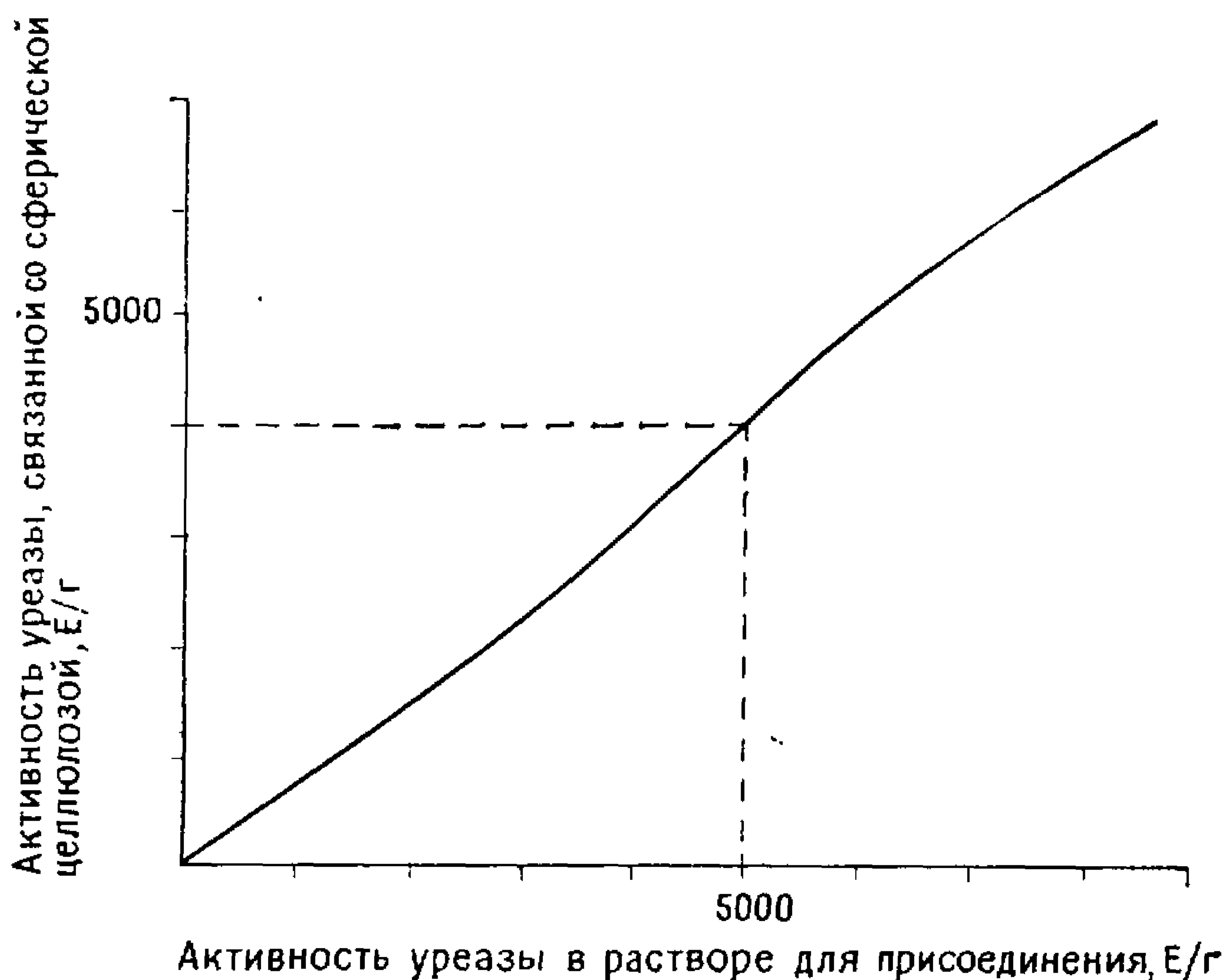


Рис. 9. Зависимость активности уреазы, иммобилизованной на сферической целлюлозе, от активности в исходном растворе для присоединения.

центрации уреазы в растворе для присоединения (рис. 9). Продукт терял активность менее чем на 30% после 1 года хранения в 50%-ном глицерине при 4 °C. Было проведено сравнение полиизоцианатного метода активации применительно к трем носителям: сферической целлюлозе, НА-ультрогелю (IBF-Reactifs, Франция) и полигидрокси-стеклу. Уреаза и альбумин были присоединены к этим носителям и к эупергиту С (Röhm Pharma GmbH). В табл. 7 показаны преимущества изоцианат-активированного материала; при этом сравнивались ферментативная активность и количество связывавшегося с матрицей альбумина. Кроме того, для полиизоцианатактивированных носителей не наблюдалось зависимости от концентрации буфера. Сравнение других поставляемых в продажу гелей с иммобилизованными ферментами представлено в табл. 8.

10. ИММОБИЛИЗАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНИЧЕСКИХ СУЛЬФОНИЛХЛОРИДОВ

10.1. Введение

Органические сульфонилгалогениды взаимодействуют с алкилгидроксисоединениями с образованием сульфонильных эфиров, которые представляют собой удобные уходящие группы. Нуклеофилы могут замещать сульфонат по реакциям S_N2-типа, что позволяет присоединять молекулы биологически активных

Таблица 7. Сравнение различных матриц для иммобилизации уреазы и альбумина

Матрица	Количество связавшейся уреазы, ед/г	Количество связавшегося альбумина, мг/г	Замечания
Полиизоцианатактивированная сферическая целлюлоза	≤7200	105	Независимо от концентрации буфера
Полиизоцианатактивированное пористое гидроксилированное стекло	3780	40	То же
Полиизоцианатактивированный НА-ультрогель	1000	Не определялось	Методика активации и присоединения для этой матрицы не оптимизированы
Эупергит С	180	0	В 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0)
	1190	16	В 0,5 М фосфатном буфере (pH 7,0)
	2400	70	В 1 М фосфатном буфере (pH 7,0)

Таблица 8. Сравнение активности[а] ряда ферментов, иммобилизованных на сферической целлюлозе, с активностью выпускаемых фирмами ферментов, иммобилизованных на полиакриламиде и агарозе

Фермент	Активность в растворе, Е		Активность, Е/г матрицы			
	Раствор для присоединения	В жидкости после стадии присоединения	Целлюлоза	Полиакриламид (Boehringer Enzygel)	Полиакриламид (Sigma)	Агароза (Sigma)
Уреаза	9500	2300	7200	500	50—60	Не производится
Глюкозооксидаза[б]	6000	2000	1100	300	10—20	»
Алкогольдегидрогеназа[в]	7500	Не определялось	7000	Не производится	50—100	1000—1500
Трипсин[в]	4560	370	1950	30	Не производится	Не производится
β-Галактозидаза[в]	460	50	240	Не производится	»	»

[а] 1 единица активности (1Е) равна количеству фермента, катализирующему реакцию 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25 °С.

[б] Присоединена в глициновом буфере (pH 3,0).

[в] Методика присоединения не оптимизирована.

веществ с целью их иммобилизации. В принципе любые гидроксилированные носители могут использоваться в этой реакции. С помощью этого метода могут быть присоединены как амино-, так и тиолсодержащие соединения. Реакционноспособность сульфонатного эфира сильно зависит от заместителя, связанного с сульфонатом. Так, CF_3->CF_3CH_2->*п*-NO_2-фенил->*п*-CH_3-фенил- реагируют в соотношении 4000 : 100 : 20 : 1 [10, 11]. Трезил (CF_3CH_2-) и тозил (*п*-CH_3-фенил) удобны как реагенты для иммобилизации ферментов. Первый обеспечивает эффективное нуклеофильное замещение при нейтральных pH и 4 °С. Отщепление тозильных групп можно контролировать по поглощению в УФ-области, причем отщепление протекает легко; однако присоединение должно проводиться при pH 9÷10,5. Нерастворимые в воде лиганды могут быть также легко присоединены в органических растворителях (например, в ацетоне). Трезилированные носители во влажном состоянии в 1 мМ HCl можно хранить в течение нескольких недель после активации без изменения их свойств.

10.2. Методика

10.2.1. Активация.

1) Сефарозу CL 6B (25 г влажного геля) промывают суспендированием последовательно в воде (75 мл), смесях вода — ацетон (3 : 1) (75 мл) и вода — ацетон (1 : 3) (75 мл) и в заключение в ацетоне (75 мл).

2) К суспензии шариков в ацетоне (10 мл) добавляют тозилхлорид (7 г), растворенный в ацетоне (10 мл),

3) Медленно перемешивают (мешалка подвесного типа) и по каплям прибавляют пиридин (7 мл).

4) Реакционную смесь перемешивают (мешалка переворачивающего типа) при комнатной температуре в течение 2 ч.

5) Шарики тщательно промывают ацетоном, водно-ацетоновой смесью и водой (растворители берут в обратном порядке по сравнению с тем, как описано в п. 1).

10.2.2. Присоединение.

1) К полученным шарикам (разд. 10.2.1) добавляют 1,5 *М* раствор амина в 0,5 *М* $NaHCO_3$ (pH 10,7 после добавления амина; 50 мл).

2) Суспензию перемешивают при 40 °С в течение 16—48 ч.

3) По окончании присоединения (периодически отбирают аликвоту и контролируют спектрофотометрически отщепление тозильных групп) носитель отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре и промывают последовательно (по 500 мл) водой, 1 м*М* HCl, 1,0 *М* $NaHCO_3$ и вновь водой.

11. ВВЕДЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП В АГАРОЗНЫЕ ШАРИКИ ПУТЕМ КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ АМИНОЭТИЛАМИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО

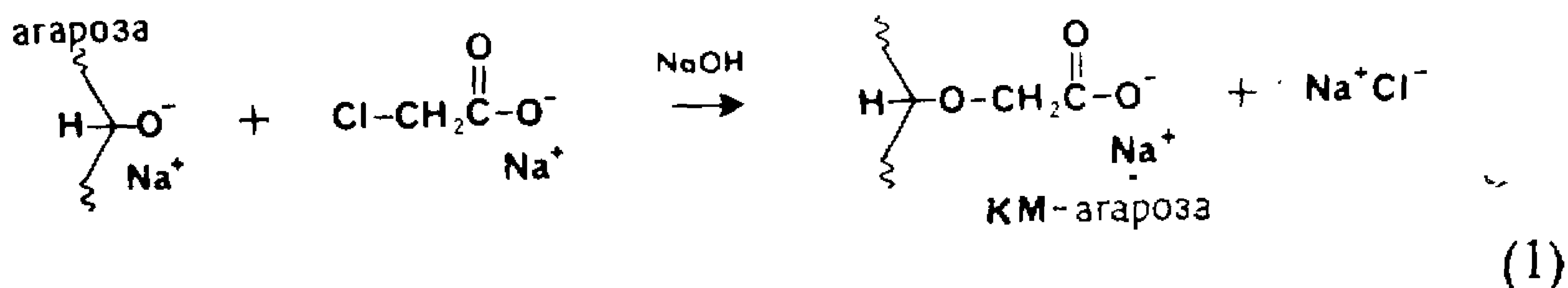
Дж. Инман (J. K. Inman)

11.1. Введение

Первоначальная функционализация агарозных шариков для получения аффинных адсорбентов часто осуществлялась путем их активации бромоцианом. Реакционноспособные цианатные эфиры и имидокарбонатные группы образуют главным образом изомочевинные связи с аминогруппами белков или других лигандов [12]. В обычных условиях применения такого рода сорбентов эти связи оказываются протонированными (и, следовательно, заряженными) и неустойчивыми при действии нуклеофилов (например, OH^-). Таким образом могут иметь место неспецифические ионные взаимодействия, а присоединенные лиганды постепенно отщепляются от носителя. Было предложено несколько других подходов к функционализации полисахаридных матриц [13—16], лишенных указанных недостатков.

Далее описан один из таких путей, начинающийся со стадии введения стабильных карбоксиметильных групп через простую эфирную связь в шарики поперечно-сшитой агарозы. Затем концевые карбоксильные группы могут активироваться и вводиться в реакции конденсации со специфическими лигандами или вставками или же превращаться в первичные аминогруппы реакцией с этилендиамином, как описано в разд. 11.2.3.

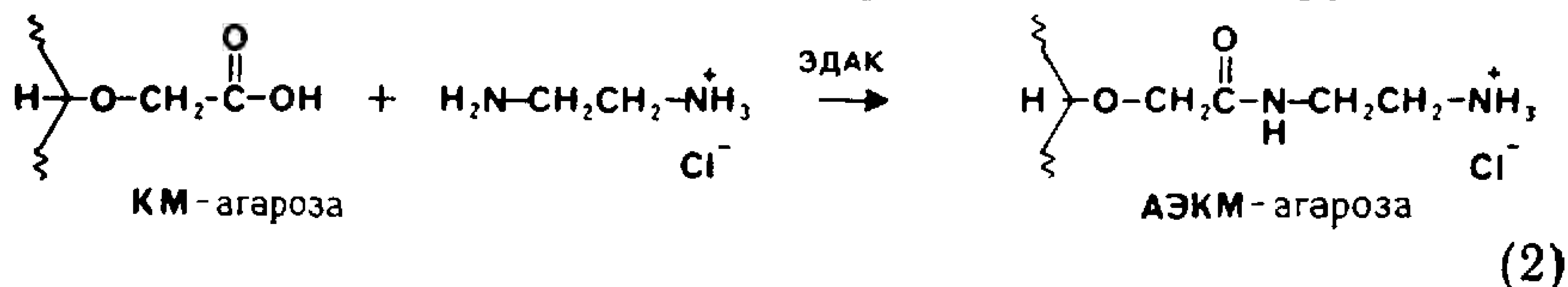
Карбоксиметилирование носителей с первичными или вторичными гидроксильными группами можно осуществить классическим синтезом простых эфиров по Вильямсону, что было продемонстрировано Петерсоном и Собером [17] в случае КМ-целлюлозы. Вицинальная конфигурация диолов не обязательна, и метод применим ко всем полигидроксилированным матрицам, выдерживающим обработку сильной щелочью в течение нескольких часов, таким, как целлюлоза, агароза, поперечно-сшитые декстраны, поли(гидроксиэтил)метакрилаты или поливиниловые спирты. Реакция проводится с хлороуксусной кислотой в избытке водного едкого натра:



(1)

Для большинства целей достаточна модификация лишь небольшой части гидроксильных групп. В описанной ниже мето-

дике применяется большой избыток хлороацетата для уменьшения времени воздействия на матрицу сильной щелочи и обеспечения кинетики приблизительно первого порядка. Последнее обстоятельство позволяет легко контролировать концентрацию вводимых КМ-групп путем проведения реакции в течение определенного времени и выбора подходящей температуры [18]. Основной побочной реакцией, не затрагивающей матрицу, является превращение хлороацетата в гликолят в результате атаки на ионы гидроксила. В приведенной здесь методике лишь ~12% реагента теряется подобным образом к моменту окончания реакции карбоксиметилирования. На следующей стадии может быть получен носитель с первичными аминогруппами:



(2)

Для обеспечения одноточечного присоединения этилендиамина к носителю используется очень большой избыток этого реагента: образуется единственная амидная связь, а вторая аминогруппа остается свободной. В качестве конденсирующего агента применяется водорастворимый карбодиимид (хлорогидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, ЭДАК). Как показано на схеме реакции [уравнение (2)], этилендиамин реагирует в форме, содержащей одну протонированную аминогруппу; однако большинство молекул протонировано по обеим аминогруппам при контролируемом pH, равном 4,6. Близко расположенный положительный заряд на другом атоме азота понижает pK_a реагирующей аминогруппы до значения ~7,1. Таким образом, при pH 4,6 реакционноспособность этой аминогруппы значительно повышается по сравнению с аминогруппой, остающейся после присоединения (pK_a~9,2), что является дополнительным фактором, способствующим одноточечному связыванию с матрицей. Более 90% карбоксильных групп могут быть превращены в аминоэтилкарбамилметил-производное (АЭКМ-производное).

В результате реакций по уравнению (1) и (2) получают аминосодержащие матрицы с простой гидрофильной структурой, полностью устойчивые в обычно используемых в аффинной хроматографии условиях. Стадия дополнительной модификации, описанная в разд. 11.2.4, приводит к тиол-матрице (3-меркаптопропионил-АЭКМ-агарозе), которая также может быть использована для получения специфических адсорбентов. Структура последней может быть представлена как $HS\text{-}CH_2CH_2\text{-}CO$-АЭКМ-агароза. Незаряженная 9-атомная вставка относительно гидрофильна, поскольку включает лишь две соседние CH_2-группы и не содержит ароматической структуры.

11.2. Методика

11.2.1. Материалы и растворы. В приведенных ниже методиках используют сферическую поперечно-сшитую агарозу, производимую фирмой Pharmacia Fine Chemicals (сефароза CL 4B). Хлороуксусную кислоту (фирма Sigma Chemical Co или Fisher Scientific Co.) необходимо оттитровать для определения содержания основного вещества (титра), поскольку продажные препараты содержат небольшое, но различное количество воды.

1) Навеску хлороуксусной кислоты (~0,8 г) растворяют в 50 мл воды.

2) Добавляют несколько капель раствора индикатора бромотимолового голубого [0,1%-ный (масс./об.) раствор в 50%-ном (об./об.) этаноле] и титруют 1,0 или 2,0 *М* NaOH.

3) Рассчитывают эквивалентный вес как вес образца кислоты в милиграммах, разделенный на милиэквиваленты использованного NaOH. 6,0 *М* NaOH получают разбавлением 10,0 *М* раствора, поставляемого фирмой Fisher Scientific Co.

1,5 *М* (20%, масс./об.) раствор дихлорогидрата этилендиамина $(CH_2)_2(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ (pH 4,6) готовят по следующей методике.

1) Дихлорогидрат этилендиамина (300 г) (Sigma или Eastman) растворяют в 1,2 л дистиллированной воды и доводят объем до 1,5 л водой.

2) Раствор перемешивают с 15 г активированного угля (например, Darco G-60) в течение 30 мин.

3) Фильтруют через складчатый фильтр (бумага Whatman № 1).

4) Доводят pH до 4,6 путем добавления 5,0 *М* NaOH.

Неиспользованный раствор можно хранить в темной стеклянной бутылке в течение многих месяцев.

Хлорогидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДАК) поставляется фирмой Sigma. N-гидроксисукцинимидный эфир 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты [также называемый N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат; СПТП] выпускается фирмами Sigma или Pharmacia.

Используется ГЭПЭК-ЭДТА-буфер (pH 7,6) состава: 0,15 *М* N-2-гидроксиэтилпиперазин-N′-2-этансульфоновая кислота+ +0,079 *М* NaOH+1,0 м*М* ди- или тринатриевая соль этилендиаминтетраацетата.

Используется еще один буфер, приготовляемый из 3 объемов ГЭПЭК-ЭДТА-буфера с pH 7,6 (вышеописанного состава) и 2 объемов N,N-диметилформамида (марки Spectro).

11.2.2. Получение шариков карбоксиметилированной (КМ)-агарозы. Стеклянную посуду надо силиконизировать для уменьшения прилипания агарозных шариков. Щелочная суспензия (см.

ниже) перед добавлением хлороуксусной кислоты охлаждается до 15 °С для компенсации тепла, выделяемого при нейтрализации, и обеспечения требуемой температуры 25 °С. Для суспендирования следует применять мешалку с мотором, поскольку перемешивание на магнитной мешалке разрушает шарики. Быстрое первое промывание приводит к окончанию реакции. Если для переноса на воронку и отмывку основной части реагентов требуется 7 мин, то общее время реакции при 25 °С составляет 75 мин (68+7). При проведении описанных ниже экспериментов следует применять меры предосторожности при работе с хлороуксусной кислотой и каустической смесью. Для предотвращения попадания реактивов на кожу или в глаза необходимо работать в защитных перчатках и очках. Методика включает следующие стадии.

1) В большой стакан помещают суспензию агарозных шариков в количестве, соответствующем ~400 мл упакованного объема.

2) Шарики суспендируют в 0,1 М NaCl (2,4 л). Суспензию перемешивают в течение 5 мин, а затем позволяют шарикам осаждаться в течение 60—90 мин. Жидкость над осевшими шариками отбирают до общего объема в стакане 600 мл и отбрасывают ее вместе с мелкими частицами.

3) Повторяют операцию (п. 2) еще три раза.

4) Осевшие шарики переносят в стакан меньшего объема и доводят объем до 600 мл с помощью 0,1 М NaCl.

5) Добавляют 600 мл 6,0 М NaOH и перемешивают смесь на ледяной бане до охлаждения до температуры 15 °С.

6) Ледяную баню убирают и добавляют 1,20 моль (на основании результатов титрования; см. выше) хлороуксусной кислоты.

7) Доводят температуру до 25,0±0,2 °С и продолжают перемешивание при этой температуре в течение 68 мин.

8) Немедленно переносят суспензию на фарфоровую воронку Бюхнера (№ 4А), покрытую влажной фильтровальной бумагой (Whatman № 1), применяя отсасывание. Быстро промывают гель 2,5 л 0,1 М NaCl.

9) Далее гель на воронке медленно промывают 10 л 0,1 М NaCl без отсасывания (раствор стекает под действием силы тяжести), увеличивая промежутки времени между последовательными порциями.

Полученную КМ-агарозу можно либо хранить при 4 °С в 0,1 М NaCl, содержащей 0,04% (масс./об.) азида натрия в качестве консерванта, либо оставить на фильтре для немедленного получения АЭКМ-агарозы.

11.2.3. Получение шариков аминоэтилкарбамилметил(АЭКМ)-агарозы. В качестве исходного материала используют КМ-про-

изводное, полученное в разд. 11.2.2 (~370 мл упакованного объема).

1) Гель промывают четырьмя порциями по 150 мл 1,5 М дихлорогидрата этилендиамина (разд. 11.2.1). После прохождения через гель каждой порции применяют краткое отсасывание.

2) Влажный гель переносят в стакан объемом 1 л. Суспендируют шарики в 1,5 М дихлорогидрате этилендиамина (в 650 мл).

3) Доводят pH до 4,6 (используя 2,0 М HCl или NaOH), добавляют порциями 5,85 г ЭДАК при перемешивании за 30 мин при комнатной температуре; перемешивание продолжают еще 30 мин. Поддерживают в ходе этой и следующей стадий pH 4,6÷4,8 (2,0 М HCl или NaOH).

4) Добавляют еще 5,85 г ЭДАК, как в предыдущей стадии, и продолжают перемешивание при контролируемом pH в течение 4 ч после окончания добавления.

5) Переносят суспензию на воронку Бюхнера (№ 4А) с фильтром (бумага Whatman № 1). Промывают шарики на воронке 8 л 0,1 М NaCl, увеличивая промежутки времени между последовательными порциями (без отсасывания). Продолжают промывание 4 л 0,4 М NaCl тем же способом и в заключение промывают еще 4 л 0,1 М NaCl.

6) Хранят полученный АЭКМ-гель в 0,1 М NaCl, содержащем 0,04% (масс./об.) азида натрия, при 4 °С.

Автор хранил шарики поперечно-сшитой АЭКМ-агарозы в течение длительного времени (~6 мес.) при —20 °С после замены 0,1 М NaCl на 2-пропанол; для этого гель тщательно промывали на воронке Бюхнера несколькими объемами 25, 50 и 75%-ного (об./об.) 2-пропанола в дистиллированной воде и в заключение 100%-ным 2-пропанолом. При необходимости отбирают аликвоты (2-пропанол не замерзает при —20 °С), нагревают до комнатной температуры и промывают требуемым буфером.

11.2.4. Определение содержания аминогрупп. Навеску АЭКМ-агарозы обрабатывают избытком СПТП [19] в смеси буфер — растворитель для превращения всех аминогрупп в 2-пиридилдитиопропионамидные группы. Последующая обработка избытком дитиотреитола (ДТТ) приводит к восстановлению образовавшейся дисульфидной связи и переходу пиридин-2-тиона в раствор; его концентрация измеряется спектрофотометрически ($\varepsilon_{макс}$=8080 при 343 нм) [19].

1) Навеску АЭКМ-агарозного геля (3,5÷4 мл упакованного объема) переносят на небольшую воронку Бюхнера с фильтром (бумага Whatman № 1).

2) Промывают 0,1 М NaCl и вторым буфером (разд. 11.2.1). Готовят суспензию в 8 мл этого буфера.

3) Растворяют 9 мг СПТП в 0,5 мл N,N-диметилформамида и добавляют этот раствор к приготовленной суспензии. Перемешивание продолжают при комнатной температуре в течение 60 мин (можно использовать магнитную мешалку).

4) Гель промывают на воронке Бюхнера тем же буфером, 0,1 М NaCl и в заключение основным буфером с pH 7,6 (см. разд. 11.2.1).

5) Далее анализ проводят с двумя пробами параллельно; для этого по 1,0÷1,5 мл упакованного объема геля, полученного на стадии 4, помещают в две силиконизированные аналитические пробирки (10×75 мм), используя основной буфер с pH 7,6 в качестве среды. Гели упаковывают путем центрифугирования в течение 2 мин при приблизительно 1500 *g*. Пробирки оставляют по крайней мере на 10 мин, отмечают положение верхней поверхности геля для последующего измерения объема. Жидкость над осадком удаляют.

6) Готовят свежий 0,2 М раствор ДТТ в основном буфере с pH 7,6. Добавляют равный объем этого раствора к каждой навеске геля; периодически смеси перемешивают в течение 45 мин при комнатной температуре.

7) Количественно переносят каждую суспензию в мерные цилиндры объемом 25 мл и доводят до метки основным буфером с pH 7,6. Перемешивают несколько минут для диффузии с шариков отщепившегося пиридин-2-тиона.

8) Гели, полученные на предыдущей стадии, центрифугируют для осаждения всех шариков. Измеряют поглощение (в 1-см кювете) прозрачного раствора над носителем при 343 нм против буфера.

9) Рассчитывают концентрацию (плотность) реакционноспособных аминогрупп с использованием уравнения:

$$\text{мкмоль/мл геля} = 25A_{343}/(8{,}08 \cdot \text{мл геля})$$

Описанная выше методика получения АЭКМ-сефарозы CL 4B приводит к продукту, содержащему 1,40 мкмоль аминогрупп/мл геля. Гели с более высоким или более низким содержанием аминогрупп можно получить пропорциональным изменением времени реакции карбоксиметилирования (причем для получения гелей с более высоким содержанием аминогрупп надо увеличивать время в большей степени, чем это следует из расчета).

11.3. Заключительные замечания

В приведенных выше методиках описывается практический подход к первоначальной функционализации агарозных шариков для последующего получения специфических аффинных ад-

сорбентов. Плотность карбоксильных, амино- или тиольных (сульфгидрильных) групп лучше всего можно контролировать, подбирая время и температуру первой реакции [уравнение (1)]; следующая реакция [уравнение (2)] и реакция тиолирования при аналитическом эксперименте (разд. 11.2.4) протекают по существу количественно. Этот подход приводит к удобным иммобилизованным функциональным группам, присоединенным к твердому носителю через абсолютно стабильные незаряженные гидрофильные связи.

Последующее присоединение специфических лигандов может быть осуществлено многими способами, включая активацию КМ-производного водорастворимым карбодиимидом, ацилирование АЭКМ-формы или алкилирование АЭКМ-амино- или 3-меркаптопропионамидных групп. Конечную плотность лиганда можно контролировать концентрацией КМ-групп, если все последующие реакции протекают количественно, или, кроме того, степенью заключительной модификации. В последнем случае обычно целесообразно блокировать остающиеся функциональные группы (например, заряженный протонированный амин). Незамещенные аминогруппы можно ацетилировать; SH-группы могут быть алкилированы иодоацетамидом при pH 8,0 предпочтительно сразу после восстановления спонтанно образующихся дисульфидных связей.

Литература

1. *Longstaff C.*, Ph. D. Thesis, Liverpool University (1983).
2. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1980).
3. *Porath J., Aspberg K., Drevin H., Axen R.*, J. Chromatogr., **86**, 53 (1973).
4. *Lamed R., Oplatka A., Reisler E.*, Biochim. Biophys. Acta, **427**, 688 (1976).
5. *Fischer E. A.*, in: Affinity Chromatography and Related Techniques, Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1982, poster A15.
6. *Wilson M. B., Nakane P. K.*, J. Immunol. Methods., **12**, 171 (1976).
7. *Fischer E. A.*, in: Poster 55 presented at the 5th International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition, June 12—17 (1983).
8. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **211**, 893 (1954).
9. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **211**, 907 (1954).
10. *Gribnau T. C. J.*, Ph. D. Thesis, Nijmegen, The Netherlands (1977).
11. *Nilsson K., Mosbach K.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **102**, 449 (1981).
12. *Kohn J., Wilchek M.*, in: Solid Phase Biochemistry, Scouten W. H. (ed.), John Wiley & Sons, New York, 1983, p. 509.
13. *Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N.*, J. Biochem., **85**, 1091 (1979).
14. *Bethell G. S., Auers J. S., Hancock W. S., Hearn M. T. W.*, J. Biol. Chem., **254**, 2572 (1979).
15. *Nilsson K., Mosbach K.*, Eur. J. Biochem., **112**, 397 (1980).
16. *Inman J. K.*, in: Affinity Chromatography and Related Techniques, Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (eds.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1982, p. 217.
17. *Peterson E. A., Sober H. A.*, J. Am. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).
18. *Inman J. K.*, J. Immunol., **114**, 704 (1975).
19. *Carlsson J., Drevin H., Axen R.*, Biochem. J., **173**, 723 (1978).

Глава 3.

ПОПЕРЕЧНО-СШИВАЮЩИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ВСТАВОК К МАТРИЦАМ

1. ВВЕДЕНИЕ

Гомо- и гетеробифункциональные реагенты описаны в большинстве руководств по афинной хроматографии. Перечень этих соединений приведен в табл. 1.

2. МЕТОДЫ ПРИСОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕОФИЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ К КАРБОКСИЛАТСОДЕРЖАЩИМ МАТРИЦАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАРБОДИИМИДОВ

Водорастворимые карбодиимиды могут применяться в виде водных растворов, а дициклогексилкарбодиимид — в растворах органических растворителей, таких, как диоксан, диметилсульфоксид или 80%-ный (об./об.) водный пиридин. Ниже описывается примерная методика присоединения.

1) Карбоксилатсодержащий носитель (например, карбоксиалкил-стекло, карбоксиалкил-агароза) (2—5 мл) прибавляют к 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимиду или к 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимиду (40 мг), растворенному в воде (10 мл), и доводят pH до 4,0.

2) Добавляют присоединяемый лиганд (10—50 мг белка или 1 мкмоль — 10 ммоль аминсодержащего лиганда) и перемешивают смесь при комнатной температуре в течение по крайней мере 1 ч (или более длительное время в случае очень низкой концентрации лиганда).

3) Реакцию заканчивают, отделяя шарики фильтрованием и промывая их водой (10 объемов) и 40%-ным (об./об.) водным диметилформамидом (1—2 л). Если позволяет природа матрицы, то более быстрое промывание можно осуществить ацетоном, 100%-ным диметилформамидом или путем кипячения.

Водорастворимые карбодиимиды были использованы также при получении ДНК-целлюлозы (гл. 5, разд. 1). Удобный прием, используемый при промывании стеклянных шариков, особенно при использовании нерастворимых в воде карбодиимидов, заключается в кипячении шариков в течение 5 мин с каждым из указанных выше растворителей или в экстракции соответ-

Таблица 1. Бифункциональные соединения, представляющие интерес для аффинной хроматографии

Соединение	Литература[a]
п-Бензохинон	1
Бис-(диазобензидин)	3
3,6-Бис-(меркуриметил)диоксан	
Бисоксираны	3
Цианурхлорид	1
п,п'-Дифторо-*м,м'*-динитрофенилсульфон	1
Дициклогексилкарбодиимид	
Диметиладипимидат	3
Диметилсуберимидат	3
Дивинилсульфон	
N,N'-Этиленбис-(иодоацетамид)	3
Глутаровый альдегид	1
Гексаметиленбис-(малеимид)	3
Гексаметилендиизоцианат	3
Периодат	1
N,N'-1,3-Фениленбис-(малеимид)	1
Феиол-2,4-дисульфонилхлорид	3
Тетраазотированный *о*-дианизидин	1
Толуолдиизоцианат	1
Водорастворимые карбодиимиды	1
Реагент К Вудворта	

[a] В цитируемой литературе содержатся полезные сравнительные данные для многих из указанных реагентов. Выбор связывающего реагента в большой степени зависит от устойчивости присоединяемого лиганда (к pH среды, температуре, растворителю и т. д.). Далее в настоящей главе описаны различные специфические реагенты и рекомендации по их использованию. При наличии сомнений относительно их специфического применения читателю следует обратиться к оригинальным статьям.

ствующим растворителем в течение ночи в аппарате Сокслета. Эта реакция, вероятно, не является самой оптимальной для лигандов, доступных в ограниченных количествах.

3. ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОКСИСУКЦИНИМИД-АГАРОЗЫ

1) Карбокси-агарозу (например, сукцинилированную аминоалкил-агарозу) тщательно промывают безводным диоксаном на пористом стеклянном фильтре с отсасыванием.

2) Агарозу суспендируют в безводном диоксане (3 объема) и добавляют при постоянном перемешивании N-гидроксисукцинимид до получения раствора с конечной концентрацией 0,1 моль/л по N-гидроксисукцинимиду.

3) Добавляют при постоянном перемешивании N,N'-дициклогексилкарбодиимид (до концентрации 0,1 моль/л) и продолжают перемешивание при комнатной температуре в течение 70 мин.

4) Шарики отделяют путем фильтрования с отсасыванием на

пористом стеклянном фильтре и промывают диоксаном (8 объемов), затем метанолом (3 объема) (метанол удаляет находящуюся в осадке дициклогексилмочевину).

5) Шарики промывают диоксаном (3 объема) и либо используют немедленно, либо при необходимости хранения тщательно сушат.

6) Для высушивания шарики промывают диоксаном (3 объема), обезвоженным пропусканием через колонку с нейтральным оксидом алюминия.

7) Суспендируют шарики в высушенном оксидом алюминия диоксане (2 объема), переносят в темную склянку, содержащую молекулярные сита (тип 4А или 5А), и герметически закрывают.

При использовании этой методики менее 10% N-гидроксисукцинимидных эфиров гидролизуется за период 4-месячного хранения.

3.1. Присоединение лигандов к агарозе, содержащей гидроксисукцинимидные сложноэфирные группы

1) Шарики переносят на пористый стеклянный фильтр при отсасывании, быстро промывают ледяной водой и добавляют к раствору лиганда в соответствующем буфере (5 объемов буфера на объем геля). В реакции можно использовать pH в интервале 5—9 при условии устойчивости лиганда при этом pH. Ацетатные, цитратные, фосфатные, боратные и бикарбонатные буферы вполне пригодны и не оказывают влияния на реакцию присоединения. Время реакции можно варьировать от 10 мин до 6 ч в зависимости от используемого pH и лиганда.

2) Реакцию прекращают путем добавления этаноламина или глицина до концентрации 1,0 моль/л. Эти амины реагируют с избытком активированного эфира.

3) Через 2 ч при комнатной температуре шарики промывают буфером, в котором далее будет использоваться матрица.

Эта методика может быть применена к карбоксиметил-целлюлозе, карбоксиакриламиду и карбоксипроизводным эупергита С или стекла с контролируемым размером пор.

4. ПОЛУЧЕНИЕ СУКЦИНИЛИРОВАННОЙ АМИНОАЛКИЛ-АГАРОЗЫ

4.1. Получение N-алкиламин-агарозы

1) Агарозу промывают на пористом стеклянном фильтре дистиллированной водой (10 объемов).

2) Агарозу (100 г) суспендируют в воде (80 мл). Добавляют 1,0 М периодат натрия (20 мл).

3) Встряхивают суспензию в течение 2 ч при комнатной температуре (лучше в темноте).

4) Окисленную агарозу промывают водой.

5) Окисленную агарозу прибавляют к 2,0 *М* солянокислому алкилдиамину (например, солянокислому гексаметилендиамину; pH 5,0; 100 мл).

6) Через 6—10 ч при комнатной температуре доводят pH до 9,0.

7) Шарики охлаждают до 0—4 °С и очень медленно (за 12 ч) добавляют 5,0 *М* борогидрид натрия (10 мл).

8) Тщательно промывают шарики 1,0 *М* NaCl; для этого шарики помещают на пористый стеклянный фильтр и в течение 3—5 ч пропускают через них раствор NaCl, причем раствор не отсасывают.

9) Оставляют шарики в 1,0 *М* NaCl на ночь.

10) Шарики промывают на фильтре 1,0 *М* NaCl в течение 3—5 ч, как в стадии 8.

4.2. Сукцинилирование

1) Аминоалкил-агарозу суспендируют в воде (1 объем) и добавляют янтарный ангидрид (10-кратный избыток по аминогруппам на агарозе), поддерживая pH 6,0 с помощью 5,0 *М* NaOH.

2) Постоянно контролируют pH, пока pH не будет оставаться постоянным по крайней мере в течение 30 мин без дальнейшего добавления NaOH.

3) При необходимости температуру реакционной смеси (25—30 °С) поддерживают с помощью ледяной бани.

4) Смесь оставляют на 5 ч при 4 °С, затем фильтруют с отсасыванием и промыванием дистиллированной водой.

5) Для определения полноты протекания реакции отбирают пробу шариков и обрабатывают ее нингидрином. Если появляется слабая сине-фиолетовая окраска, процесс сукцинилирования повторяют, вновь добавляя избыток янтарного ангидрида; суспензию оставляют на 5 ч при комнатной температуре.

5. АЦИЛАЗИДНАЯ АКТИВАЦИЯ

5.1. Получение гидразидо-агарозы

1) Адипоилгидразид получают путем кипячения диэтилового эфира адипиновой кислоты (100 мл) с гидразингидратом (200 мл) и этанолом (200 мл) в течение 3 ч. По охлаждении реакционной смеси до комнатной температуры осаждается адипоилгидразид.

2) Адипоилгидразид перекристаллизовывают из водного этанола (т. пл. 169—171 °C).

3) Шарики CNBr-активированной агарозы, полученные, как описано в гл. 2, смешивают с насыщенным на холоду раствором адипоилдигидразида в 0,1 М Na_2CO_3 (pH 9,0; 2 объема).

4) Шарики осторожно встряхивают в течение ночи и затем тщательно промывают на пористом стеклянном фильтре дистиллированной водой, 2,0 М NaCl и вновь дистиллированной водой.

5.2. Получение ацилазидо-агарозы

Ниже описана методика перевода гидразидо-агарозы в ацилазидо-агарозу.

1) Шарики гидразидо-агарозы суспендируют в ледяной 1,0 М HCl (1 объем). К суспензии добавляют ледяной 0,5 М $NaNO_2$ (1 объем).

2) Поддерживают температуру 0 °C в течение 15—20 мин, шарики отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре с отсасыванием и промывают ледяной 0,1 М HCl.

3) Из склянки для отсасывания выливают фильтрат и шарики быстро промывают ледяной 0,1 М сульфаминовой кислотой и затем ледяной водой.

4) Промытые шарики суспендируют в 0,2 М $NaHCO_3$ (pH 9,5; 10 объемов), содержащем присоединяемый лиганд. Концентрация лиганда зависит от его цены, химических свойств и доступности.

Для присоединения белков лучше всего использовать растворы с концентрациями 5—20 мг/мл, в то время как лиганды меньшей молекулярной массы могут присоединяться и при концентрациях 10—100 ммоль/л. В случае полиаминосоединения, например лизина, присоединение должно быть осуществлено преимущественно через α-, а не через ε-аминогруппу путем понижения pH раствора для присоединения; используют 0,5 М фосфатный буфер (pH 6,0). По существу аналогично получают и используют ацилазидные производные полиакриламида.

6. ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ НА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ШАРИКАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА

С. Арамэ (S. Avrameas)

6.1. Получение и активация шариков

Для гидратации полиакриламидных шариков их выдерживают в течение 24 ч в дистиллированной воде и затем несколько

раз промывают дистиллированной водой. Промывание полиакриламидных шариков продолжают до полной прозрачности промывных вод.

6.2. Активация шариков

1) Отделенные декантацией шарики (100 мл) прибавляют к дистиллированной воде (250 мл), к смеси добавляют 1,0 М фосфатный буфер (рН 7,4; 50 мл) и 25%-ный (об./об.) глутаровый альдегид (100 мл).

2) Смесь оставляют при 37 °С на ночь.

3) Шарики тщательно промывают дистиллированной водой [промывные воды отделяют последовательными декантациями, путем использования пористого стеклянного фильтра или многократным центрифугированием при 4000 об/мин (например, для биогеля Р 300—400 меш)] до отсутствия запаха глутаральдегида и поглощения при 280 нм в промывных водах.

Подготовленные таким образом активированные шарики можно хранить в дистиллированной воде при 4 °С по крайней мере в течение месяца без заметной потери белок-связывающей емкости.

6.2.1. Присоединение белков к активированным шарикам. После центрифугирования шарики (10 мл) прибавляют к присоединяемому белку (10—50 мг) в фосфат-NaCl-буфере (10 мл; состав: 0,01 М фосфат, рН 7,4, содержащий 0,15 моль/л NaCl). Суспензию перемешивают на роторном смесителе в течение ночи при комнатной температуре (или в случае необходимости при 4 °С).

6.2.2. Емкость гелей. С гелем может связаться максимально ~3 мг белка на 1 мл геля. Если требуется высокое содержание белка в геле, то в реакцию присоединения следует вводить 30—50 мг белка. В то же время следует заметить, что если требуется иммобилизовать как можно больше введенного в реакцию белка, нужно использовать относительно низкую концентрацию белка (10—20 мг) в растворе для реакции присоединения.

6.2.3. Выбор геля. Для колоночных процессов обычно применяются биогель Р 300 (50—100 меш) и акриламид-агарозные шарики. Для бетч-процессов рекомендуется биогель Р 300 (400 меш). Аналогичные методики описаны для магногеля 44 (см. гл. 1, разд. 2.6 и 8 и в литературе к гл. 1 работу [4]).

7. МЕТОДИКИ ПРИСОЕДИНЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИВИНИЛСУЛЬФОНА

7.1. Активация агарозных шариков

1) Влажную агарозу (10 г) промывают водой; воду удаляют путем отсасывания.

2) Агарозу суспендируют в 1,0 М бикарбонате натрия (pH 11,0; 10 мл).

3) К суспензии добавляют дивинилсульфон (2 мл).

4) Реакцию продолжают при перемешивании около 1 ч при комнатной температуре.

5) Шарики промывают водой.

Осторожно! Дивинилсульфон токсичен.

7.2. Присоединение к дивинилсульфон-агарозе

1) Амино- или гидроксилсодержащий лиганд растворяют в 1,0 М карбонате натрия до получения раствора с концентрацией 250 мг/мл.

2) Этот раствор прибавляют к активированной дивинилсульфон-агарозе (10 г) и осторожно перемешивают. Необходимое для полного взаимодействия время зависит от температуры реакции (например, при 50 °С реакцию продолжают 2 ч, а при 4 °С — 24 ч).

3) По окончании реакции шарики промывают 1,0 М Na_2CO_3 (pH 11,0; 10 мл), затем 0,2 М глицином-HCl (pH 3,0), содержащим 1,0 М NaCl (500 мл), 1,0 М NaCl (500 мл) и водой (500 мл).

8. МЕТОДИКИ ПРИСОЕДИНЕНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДИАЗОНИЕВЫХ ГРУПП

8.1. Получение NAD-агарозы

1) Готовят, как описано в гл. 2 (разд. 1), охлажденную и промытую CNBr-активированную сефарозу (50 мл).

2) Воду удаляют путем отсасывания на пористом стеклянном фильтре.

3) Гель перемешивают в течение ночи при 4 °С в 1,0 М гексан-1,6-диамине (100 мл), предварительно доведенном до pH 10,0 при помощи HCl.

4) Аминогексил-агарозу тщательно промывают дистиллированной водой и готовят суспензию в 50%-ном (об./об.) водном предварительно перегнанном диметилформамиде; смесь перемешивают в течение 3—4 ч при комнатной температуре с 250 мл

раствора 0,07 M *п*-нитробензоилазида в смеси 40% (об./об.) диметилформамида — 60% 0,2 M бората (pH 9,3).

5) *п*-Нитробензамидогексил-агарозу промывают 50%-ным (об./об.) диметилформамидом (1 л) и дистиллированной водой.

6) Гель перемешивают в течение 1 ч при 37 °C в 0,5 M $NaHCO_3$, содержащем 0,1 моль/л дитионита натрия (pH 8,5; 150 мл).

7) Полученную *п*-аминобензамидогексил-агарозу промывают дистиллированной водой (1,5 л), охлаждают до 0 °C; прибавляют в течение 10 мин 2,5 объема охлажденного 0,1 M $NaNO_2$ в 0,5 M HCl при перемешивании.

8) Полученное *п*-диазопроизводное промывают холодной дистиллированной водой (250 мл), 1%-ной (масс./об.) сульфаминовой кислотой (50 мл) и дистиллированной водой (250 мл), а затем в течение ночи перемешивают при 4 °C с 0,1 M NAD в 0,2 M боратном буфере (pH 8,3).

9) Производное бензамидогексил-сефарозы с иммобилизованным NAD отделяют путем фильтрования и тщательно промывают.

8.2. Получение диазоний-агарозы

1) Готовят, как описано в гл. 2 (разд. 1), ледяную промытую CNBr-активированную сефарозу (50 мл).

2) Воду удаляют путем отсасывания на пористом стеклянном фильтре.

3) Гель перемешивают в течение ночи при 4 °C в 1,0 M бензамидине (100 мл), предварительно доведенном до pH 10,0 с помощью HCl.

4) Бензамидин-агарозу тщательно промывают дистиллированной водой и проводят реакцию диазотирования. Для этого перемешивают в течение 10 мин с 2,5 объемами охлажденного 0,1 M $NaNO_2$ в 0,5 M HCl.

5) *п*-Диазопроизводное промывают охлажденной дистиллированной водой (250 мл), 1%-ной (масс./об.) сульфаминовой кислотой (50 мл) и вновь дистиллированной водой (250 мл), а затем обрабатывают в течение ночи при 4 °C соответствующим лигандом в 0,2 M боратном буфере (pH 8,3).

6) Агарозу отделяют путем фильтрования и тщательно промывают.

Внимание! Бензамидин высокотоксичен.

Подобная методика может быть проведена с использованием *м*-аминонитробензола. При этом лиганд иммобилизуется через аминогруппу, последующее восстановление нитрогруппы дитионитом и диазотирование проводят, как описано выше.

9. ПРИСОЕДИНЕНИЕ ЛИГАНДОВ ЧЕРЕЗ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ АЗОКРАСИТЕЛИ

Т. Грибнау (T. C. J. Gribnau)

9.1. Получение регенерированной целлюлозы

1) Готовят раствор хлопка-сырца (3,3 г) под азотом в 1 л раствора гидрооксида тетрамминмеди [12 г $Cu(OH)_2$ и 2 г CuCl в 1 л 25%-ного (насыщенного) водного аммиака].

2) Темно-синий вязкий раствор фильтруют через стекловату под давлением азота и затем вводят при постоянном перемешивании в 5%-ный (масс./об.) водный калий-натрий тартрат (1 л); поддерживают нейтральный pH постоянным добавлением уксусной кислоты.

3) Выпавшую в осадок целлюлозу собирают и тщательно промывают 5%-ной (об./об.) уксусной кислотой и водой. Продукт можно хранить в 0,1% (масс./об.) водном NaN_3 при 4 °С.

9.2. Определение содержания целлюлозы в суспензии регенерированной целлюлозы

1) Продукт, полученный по методике, описанной в разд. 9.1, помещают в стакан и прибавляют 0,1%-ный (масс./об.) водный раствор NaN_3 до содержания целлюлозы ~20 мг/мл. Эффективно перемешивают до получения гомогенной суспензии и немедленно отбирают 1 мл в предварительно взвешенную коническую центрифужную пробирку (например, Eppendorf Reaktionsgefäss, 1,5 мл, тип 3810).

2) Пробу центрифугируют при 12 000 *g* (~15 000 об./мин) в течение 3 мин; супернатант сливают (или осторожно отбирают с помощью пипетки) и добавляют 1 мл дистиллированной воды.

3) Целлюлозу вновь суспендируют и центрифугируют.

4) Повторяют эту стадию три раза с использованием дистиллированной воды и затем три раза с ацетоном (продажной степени чистоты).

5) Избыток ацетона, удерживаемый твердым остатком, удаляют путем нагревания прямо в центрифужной пробирке ($\leqslant$56 °С) в течение ~15 мин.

6) Остаток в пробирке сушат в вакууме над концентрированной серной кислотой при комнатной температуре в течение ночи.

7) Пробирку с содержимым выдерживают при комнатной температуре и нормальной влажности в течение 2 ч перед окончательным взвешиванием.

Препарат регенерированной по описанной в разд. 9.1 методике целлюлозы должен содержать в суспензии ~20 мг/мл целлюлозы. Хранят суспензию при 4 °С.

9.3. Присоединение реакционноспособного азокрасителя к регенерированной целлюлозе и восстановление до аминоарил-целлюлозы

1) Суспензию целлюлозы (разд. 9.2) тщательно перемешивают и отбирают объем, содержащий ~1 г целлюлозы (50 мл).

2) Целлюлозу отделяют путем фильтрования (пористый стеклянный фильтр; например, Schott & Gen, Mainz, 3D-3) или центрифугирования (~1000 *g*) и тщательно промывают дистиллированной водой (3 раза по 50 мл).

3) Целлюлозу вновь суспендируют в дистиллированной воде (5—10 мл) и нагревают до 40—45 °С.

4) К суспензии прибавляют левафикс бриллиантовый красный Е-4ВА (фирма Bayer; 25 мг), растворенный в дистиллированной воде (10 мл).

5) Смесь перемешивают в течение 5 мин (40—45 °С), добавляют $NaCl$ (2,5 г), растворенный в дистиллированной воде (10 мл), и перемешивают еще в течение 30 мин (40—45 °С).

6) Прибавляют твердый безводный Na_2CO_3 (0,5 г) и перемешивают еще 90 мин (40—45 °С).

7) Окрашенную целлюлозу отмывают от несвязавшегося красителя дистиллированной водой на пористом стеклянном фильтре или центрифугированием (~1000 *g*).

8) Окрашенную целлюлозу вновь суспендируют в дистиллированной воде (10 мл) и нагревают до 65—70 °С.

9) Прибавляют твердый дитионат натрия ($Na_2S_2O_4$, 0,5÷1 г), что приводит к быстрому обесцвечиванию целлюлозы (*Внимание!* Реакцию надо проводить в хорошо работающем вытяжном шкафу); жидкая фаза остается желтой.

10) Аминоарил-целлюлозу отделяют путем фильтрования или центрифугирования и тщательно промывают дистиллированной водой.

11) Аминоарил-целлюлозу вновь суспендируют в 0,1% (об./об.) водном растворе NaN_3 и хранят при 4 °С в темноте.

9.4. Диазотирование аминоарил-целлюлозы и присоединение белков

Внимание! Реакции проводят в хорошо работающем вытяжном шкафу.

1) Суспензию целлюлозы (полученную по методике, описанной в разд. 9.3) тщательно перемешивают и отбирают объем, содержащий ~1 г целлюлозы.

2) Суспензию переносят на пористый стеклянный фильтр (например, Schott & Gen, Mainz; 3D-3), удаляют воду путем отсасывания и тщательно промывают целлюлозу дистиллированной водой (3 раза по 40 мл).

3) Целлюлозу тщательно сушат на фильтре с отсасыванием, а затем суспендируют в 0,1 М HCl (30 мл), предварительно охлажденной до 0÷4 °С.

4) Суспензию эффективно перемешивают, поддерживая температуру 0÷4 °С.

5) К суспензии прибавляют предварительно охлажденный (0÷4 °С) 1,0 М $NaNO_2$ (3 мл); перемешивание продолжают в течение 45 мин, поддерживая температуру 0÷4 °С.

6) Реакционную смесь переносят на пористый стеклянный фильтр; продукт — диазотированную аминоарил-целлюлозу — тщательно промывают предварительно охлажденной (0÷4 °С) дистиллированной водой, пока pH фильтрата не станет равным pH дистиллированной воды (6,0÷7,0).

7) Целлюлозу промывают охлажденным (0—4 °С) боратным буфером (2 раза по 40 мл).

8) Для приготовления боратного буфера растворяют H_3BO_3 (12,36 г) и $NaCl$ (2,92 г) в дистиллированной воде (900 мл), прибавляют 1,0 М раствор $NaOH$ (55,2 мл), доводят pH до 8,6 1,0 М $NaOH$ или HCl и доводят общий объем до 1 л.

9) Целлюлозу отфильтровывают и суспендируют в соответствующем растворе белка (растворы для присоединения не должны содержать азид натрия). Белок должен быть растворен в указанном выше боратном буфере; в случае антител барана против IgG кролика используют ~100 мг IgG/г целлюлозы.

10) Для достижения максимальной эффективности присоединения используют наименьший возможный конечный объем реакционной смеси; вместе с тем должна быть обеспечена возможность гомогенного перемешивания (магнитная или роллерная мешалка).

11) Через 5—10 мин к реакционной смеси прибавляют 30%-ный (масс./об.) $NaCl$ (1 мл) и проводят реакцию присоединения белка в течение 20—22 ч при 4 °С.

12) Производное целлюлозы отфильтровывают через пористый фильтр и дважды промывают на фильтре дистиллированной водой (2 раза по 40 мл).

13) Измеряют объемы каждого из трех фильтратов и определяют содержание в них белка; это позволяет достаточно точно рассчитать степень присоединения белка.

14) Промывают адсорбент на фильтре двумя последовательными порциями по 40 мл раствора β-нафтола (при комнатной температуре); при этом блокируется избыток диазониевых групп, что приводит к получению окрашенной в оранжевый цвет целлюлозе.

15) Раствор β-нафтола используется свежеприготовленным Готовят его так: 0,75 г β-нафтола прибавляют к 1 л боратного буфера (состав указан выше). Суспензию перемешивают в тече-

ние 1 ч при комнатной температуре в темноте, а затем фильтруют.

16) Остаток на фильтре промывают двумя порциями по 40 мл боратного буфера и затем тремя порциями по 40 мл фосфатного буфера; производное целлюлозы суспендируют в том же буфере и хранят при 4 °С.

17) Для приготовления фосфатного буфера в 1 л дистиллированной воды растворяют мертиолат натрия (1 г) или азид натрия (1 г), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (2,46 г), KH_2PO_4 (0,72 г), NaCl (1,125 г) и Na_2(ЭДТА)$\cdot 2H_2O$ (2,0 г).

18) Определение содержания производного целлюлозы в суспензии выполняют по методике, описанной в разд. 9.2.

9.5. Присоединение гонадотропина хориона человека к сефарозе CL 4B с использованием активации реакционноспособным азокрасителем

Присоединение осуществляют в соответствии со схемой последовательных реакций, представленной на рис. 1.

9.5.1. Присоединение реакционноспособного красителя к сефарозе CL 4B.

1) К сефарозе CL 4B (25 г отфильтрованного геля) прибавляют левафикс бриллиантовый красный Е-4ВА (фирма Bayer; 125 мг), растворенный в дистиллированной воде (12,5 мл).

2) Поднимают температуру реакционной смеси при постоянном перемешивании до 40 °С.

3) Прибавляют твердый NaCl (2,29 г) и перемешивают суспензию в течение 30 мин при 40 °С.

4) Прибавляют твердый безводный Na_2CO_3 (1,4 г) и перемешивают суспензию в течение 90 мин при 40 °С.

5) Производное краситель-сефароза отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре и тщательно промывают дистиллированной водой; измеряют поглощение при 512 нм объединенных фильтратов (в 1-см кюветах).

6) Степень присоединения красителя (в процентах) можно рассчитать, принимая поглощение 1%-ного раствора левафикса бриллиантового красного Е-4ВА в указанных условиях равным 176.

7) Окрашенную сефарозу суспендируют в 0,2 М водном этаноламине (30 мл), предварительно доведенном до pH 10,0 концентрированной HCl, суспензию перемешивают в течение 30 мин при 40 °С.

8) Сефарозу отфильтровывают и тщательно промывают дистиллированной водой, пока pH фильтрата не станет равным 6÷7.

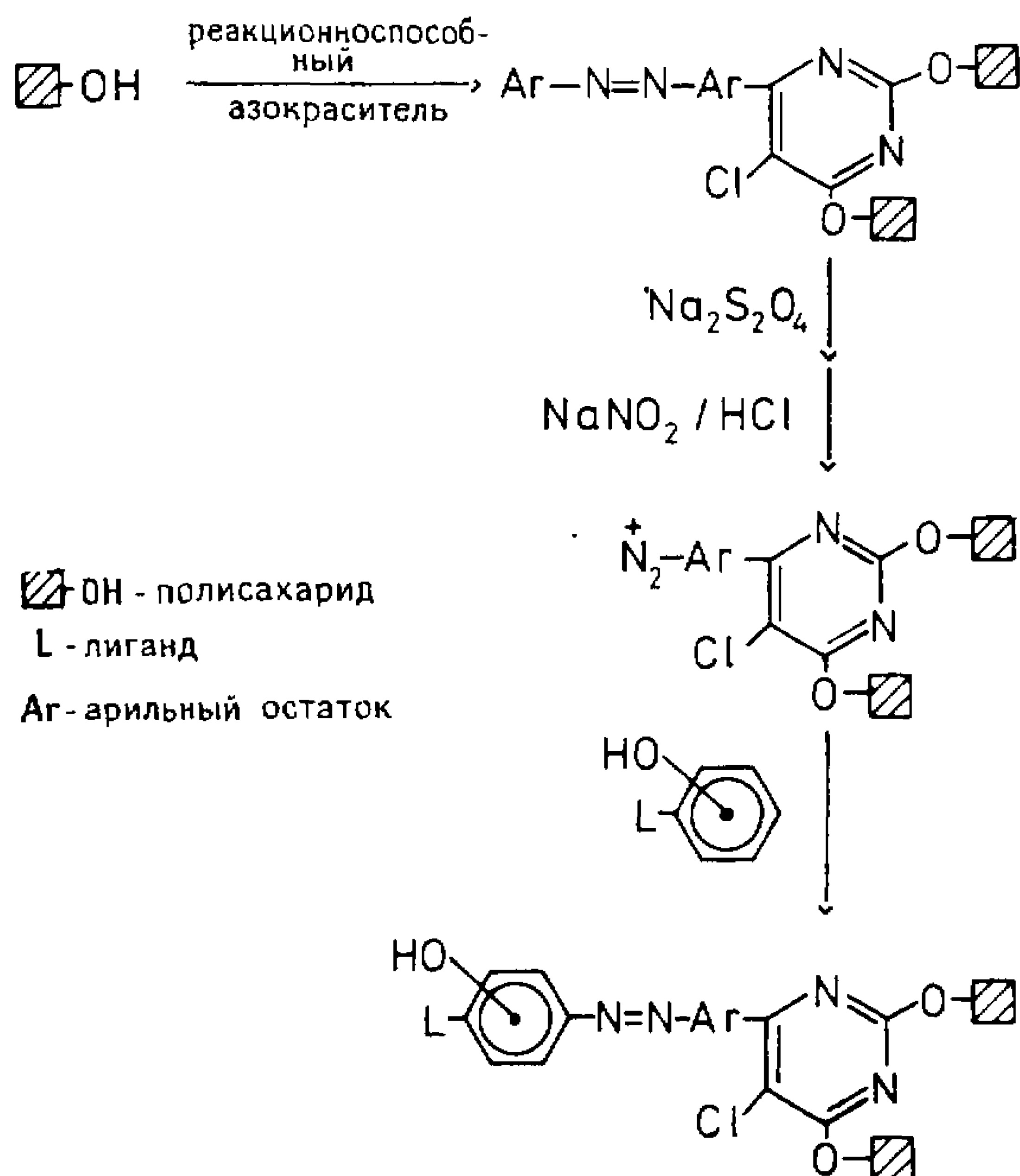


Рис. 1. Присоединение ГХЧ к сефарозе CL 4B с использованием активации реакционноспособными азокрасителями.

9.5.2. Восстановление производного краситель-сефароза до аминоарил-сефарозы.

1) Продукт, полученный по методике, описанной в разд. 9.5.1, суспендируют в дистиллированной воде (30 мл) и суспензию нагревают до 60 °C.

2) Прибавляют твердый дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$; 1,25 г), что приводит к немедленному обесцвечиванию сефарозы; жидкая фаза остается желтой.

3) Сефарозу отфильтровывают и тщательно промывают дистиллированной водой (8 раз по 50 мл).

9.5.3. Диазотирование аминоарил-сефарозы; присоединение гонадотропина хориона человека (ГХЧ).

1) Продукт, полученный по методике, описанной в разд. 9.5.2, суспендируют в 0,1 М HCl (45 мл) и прибавляют 1,0 М $NaNO_2$ (9 мл).

2) Реакционную смесь перемешивают в течение 30 мин при 4 °C.

3) Диазотированную аминоарил-сефарозу отфильтровывают, тщательно промывают дистиллированной водой (4 °C) до pH

фильтрата 6÷7 и затем промывают боратным буфером (pH 8,6; 4 °С; 3 раза по 50 мл).

4) Влажный диазотированный носитель (20 г) суспендируют в боратном буфере (pH 8,6; 4 °С; 15 мл); прибавляют раствор ГХЧ в боратном буфере (pH 8,6; 10 мл; 1 мг/мл) и проводят реакцию присоединения в течение 16 ч при 4 °С (рекомендуется перемешивание на роллерной мешалке).

5) Продукт отфильтровывают, промывают боратным буфером (pH 8,6; 4 раза по 50 мл; фильтраты — *А*), раствором β-нафтола в боратном буфере (pH 8,6; 0,75 г/л; 3 раза по 50 мл), боратным буфером (pH 8,6; 5 раз по 50 мл) и в заключение боратным буфером (pH 7,0), содержащим NaN_3 (1 г/л).

Составы боратных буферов

pH	Содержание, г/л		
	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	H_3BO_3	NaCl
7	1,43	11,47	—
8,6	10,49	5,57	2,93

Используют свежеприготовленный раствор β-нафтола; для этого β-нафтол (0,75 г) прибавляют к боратному буферу (pH 8,6; 1 л), перемешивают раствор в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте и фильтруют.

6) Хранят ГХЧ-сефарозу при 4 °С в виде суспензии в указанном боратном буфере.

Буферы для присоединения не должны содержать азид натрия, так как N_3^--группы замещают $N_2^+Cl^-$-группы, препятствуя таким образом присоединению белка (лиганда). Содержание ГХЧ в объединенных фильтратах *А* определяется иммуноферментным методом, что позволяет установить содержание ГХЧ на аффинном сорбенте; обработка производного сефарозы β-нафтолом приводит к немедленному появлению красно-оранжевой окраски.

10. ПОЛУЧЕНИЕ ТИОЛ-АГАРОЗ

10.1. Активированная глутатион-агароза

1) Проводят активацию 50 г агарозы бромцианом (гл. 2, разд. 1, или любым другим методом, описанным также в гл. 2).

2) Активированную агарозу промывают 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 8,5; 10 объемов), затем смешивают с равным объемом того же буфера, содержащего 20 мг глутатиона/г агарозы.

3) Смесь встряхивают в течение 20 ч при 22 °С.

4) Гель промывают 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 9,5; 10 объемов) на пористом стеклянном фильтре. Переносят в колонку (1,8×

×30 см, ~50 мл) и последовательно промывают (порциями по 240 мл) следующими растворами:

0,1 М $NaHCO_3$, (pH 9,5), содержащим 1,0 моль/л NaCl и 1 ммоль/л ЭДТА;

0,1 М ацетатом натрия (pH 4,3). содержащим NaCl и ЭДТА в тех же концентрациях;

1 мМ ЭДТА.

При пропускании через колонку каждого раствора рекомендуется скорость потока 10 мл/ч.

5) Влажный гель (50 г) переносят на пористый стеклянный фильтр и промывают 0,1 М трис-HCl (pH 8,0; 450 мл), содержащим 0,3 ммоль/л NaCl и 1 ммоль/л ЭДТА.

6) Остаток жидкости удаляют и промытый гель суспендируют в том же буфере (60 мл), содержащем 30 ммоль/л дитиотреитола (ДТТ); смесь оставляют на 10 мин для восстановления всех доступных сульфгидрильных остатков.

7) Гель промывают следующими растворами (по 150 мл каждого): 1 М NaCl, 0,5 М $NaHCO_3$, 0,3 М NaCl, 0,1 М трис-HCl (pH 9,0) и 0,3 М NaCl; каждый раствор содержит 1 ммоль/л ЭДТА.

8) Для активации восстановленный и промытый гель оставляют при осторожном встряхивании в течение 30 мин с 1,5 мМ 2,2'-дипиридилдисульфидом при комнатной температуре.

9) Активированную глутатион-2-пиридилдисульфид-агарозу промывают для удаления избытка 2,2'-дипиридилдисульфида, как описано в п. 7.

10) Заключительную промывку 0,1 М трис-HCl и 0,3 М NaCl (pH 8,0), содержащим 1 ммоль/л ЭДТА, следует контролировать путем измерения поглощения при 280 нм.

11) Промывание продолжают до отсутствия поглощения при 280 нм в промывных водах.

10.2. Получение тиопропил-агарозы

1) Шарики 6%-ной агарозы (30 г) промывают водой и отфильтровывают на пористом стеклянном фильтре с отсасыванием.

2) Шарики суспендируют в 1,0 М NaOH (24 мл). К суспензии при перемешивании прибавляют эпихлорогидрин (0,75 мл) при комнатной температуре. Это должно привести к конечному содержанию тиольных групп 50 мкмоль/г сухой агарозы.

3) Перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин, затем повышают температуру до 60 °С и продолжают перемешивание еще в течение 2 ч.

4) Полученные эпокси-шарики промывают водой до нейтральной реакции промывных вод, а затем несколькими объемами 0,5 М фосфата натрия (pH 6,2).

5) Сразу после этого шарики отфильтровывают с отсасыванием и добавляют к ним 2,0 *М* тиосульфат натрия (30 мл).

6) Шарики перемешивают в растворе тиосульфата в течение 6 ч при комнатной температуре, промывают ДТТ (8 мг/мл) в 1 м*М* ЭДТА (по крайней мере 2-кратным избытком к содержанию эпоксидов; достаточно 4 мл раствора ДТТ).

7) Через 30 мин при комнатной температуре шарики отделяют от раствора восстановителя путем фильтрования с отсасыванием (водоструйный насос) и последовательно промывают порциями по 30 мл 0,1 *М* $NaHCO_3$, содержащим 1,0 ммоль/л NaCl и 1 ммоль/л ЭДТА, затем 1 м*М* ЭДТА и в заключение 0,01 *М* ацетатом натрия (pH 4,0), содержащим 1 ммоль/л ЭДТА. В процессе промывания важно исключить попадание воздуха в шарики, а также защитить их от дальнейшего окисления на воздухе путем хранения под дегазированным 0,01 *М* ацетатом натрия (pH 4,0). Поскольку в течение месяца наблюдается уменьшение концентрации свободных тиольных групп на 80% [5], следует осуществлять восстановление шариков непосредственно перед использованием. Шарики, хранившиеся в течение длительного времени, могут быть регенерированы до их исходной емкости восстановлением ДТТ.

10.2.1. Активация восстановленной тиопропил-агарозы.

1) Шарики (для обеспечения максимального содержания сульфгидрильных групп следует использовать свежевосстановленные шарики) промывают водой и затем 50%-ным (об./об.) водным ацетоном.

2) Гель суспендируют в 50%-ном (об./об.) водном ацетоне, содержащем 2-пиридиндисульфид (100 мг), растворенный в минимальном количестве смеси ацетон — вода.

3) Смесь перемешивают в течение 30—60 мин при комнатной температуре, фильтруют и промывают 50%-ным (об./об.) водным ацетоном.

4) В заключение промывают шарики 1 м*М* ЭДТА (pH 7,0). В результате активации получают устойчивые во времени шарики, которые можно хранить по крайней мере 6 мес при 40 °С с небольшой потерей активных тиольных групп.

Литература

1. *Avrameas S., Ternynck T., Guesdon J.*, Scand. J. Immunol., 8, 7 (1978).
2. *Wold F.*, in: Methods in Enzymology, Vol. 11, Hirs C. H. W. (ed.), Academic Press Inc., New York and London, 1967, p. 617.
3. *Lowe C. R., Dean P. D. G.*, in: Affinity Chromatography, published by J. Wiley & Sons, London, 1974, p. 234.
4. *Hocking J. D., Harris J. I.*, FEBS Lett., 34, 280 (1973).
5. *Axen R., Drevin H., Carlsson J.*, Acta Chem. Scand., 29, 471 (1975).

Глава 4.

МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИГАНДА НА СОРБЕНТЕ

1.1. Дифференциальный анализ

Количество лиганда, присоединенного к гелю (на единицу массы или объема геля), часто определяют по разности между полным количеством лиганда, добавленного в реакционную смесь, и количеством лиганда, возвращенного после интенсивной промывки геля. Во многих случаях такой подход дает вполне удовлетворительные результаты при условии, что содержание лиганда можно количественно определять с помощью чувствительных спектрофотометрических, флуориметрических или радиометрических методов. Кроме этих методов можно использовать также ЯМР- и ЭПР-спектроскопию и гравиметрический анализ.

1.2. Спектрофотометрия гелей

Если лиганды поглощают при длинах волн >250 нм, то можно определить концентрацию связанного лиганда прямой спектрофотометрией геля. Для этого гель суспендируют в оптически чистом этиленгликоле, глицерине, концентрированном растворе сахарозы или 1%-ном (об./об.) водном полиэтиленгликоле (polyox WSR 301) и измеряют поглощение приготовленного образца против суспензии той же концентрации немодифицированного геля в двухлучевом спектрофотометре. Важно, чтобы гели были тщательно промыты суспензионной средой перед измерением.

1.3. Солюбилизация гелей

Существует ряд методов солюбилизации модифицированных агарозных гелей, что позволяет проводить количественное спектрофотометрическое определение иммобилизованного лиганда. Модифицированные агарозные гели могут быть солюбилизированы нагреванием при 75 °C в 1) 0,1 M HCl; 2) 0,1 M NaOH — 0,1% (масс./об.) $NaBH_4$ или 3) 50%-ной (об./об.) уксусной кислоте. Для различных препаратов условия солюбилизации меняются; их устанавливают методом проб и ошибок.

1.4. Кислотный или ферментативный гидролиз

Достаточно жесткая обработка адсорбента с иммобилизованным лигандом приводит к гидролизу связи матрица — лиганд и выделению лиганда или продукта его деградации, которые можно количественно определить. Как правило, полный гидролиз иммобилизованных на агарозе лигандов может достигаться нагреванием в течение 1 ч при 100 °С в 0,5 *М* HCl. По другой методике, заключающейся в гидролизе в вакууме в 6,0 *М* HCl в течение 24 ч при 110 °С, получают продукты, удобные для аминокислотного анализа, что особенно полезно для аминокислотных и белковых лигандов.

1.5. Элементный анализ

В тех случаях, когда иммобилизованный лиганд содержит особый элемент, достоверное определение концентрации лиганда можно провести с помощью элементного анализа. Так, анализ фосфата удобен для иммобилизованных нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а анализ на серу был использован для определения сульфаниламида, присоединенного к CNBr-активированной агарозе [1]. Может быть использован элементный анализ на азот, бром или фосфор, несмотря на то что стадии получения адсорбентов, такие, как бромоцианактивация, включают реагенты, содержащие некоторые или все указанные элементы. Следует отметить, что при проведении CNBr-активации в присутствии фосфатного буфера в агарозные гели может вводиться иммобилизованный фосфат.

Предварительные результаты показывают, что этот метод может быть применен к эупергиту с иммобилизованными лигандами типа бутиламина.

1.6. Радиоактивные методы

Один из наиболее чувствительных методов определения концентрации иммобилизованных лигандов заключается во введении на стадии присоединения радиоактивно меченного лиганда. Концентрацию иммобилизованного лиганда можно определить дифференциальным анализом, а также путем отщепления (гидролиза) лиганда или непосредственными исследованиями геля. Например, аликвоты геля, содержащего [^{32}P]-GTP, суспендируют в растворе Брея и определяют радиоактивность непосредственно с помощью сцинтилляционного счетчика [2]. Такой же подход используется при прямом определении ^{131}I-меченых белков.

1.7. Определение аминов с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС)

1.7.1. Материалы. Кристаллическая ТНБС (фирма Eastman) и лиофилизованные препараты бычьего сывороточного альбумина (фирма Sigma) используются без дальнейшей очистки. Все аминокислоты, амины и соли имели продажную степень чистоты. Используют растворы аминосоединений в 0,1 *М* тетраборате натрия (рН 9,3).

1.7.2. Методика.

1) 0,03 *М* ТНБС (25 мкм) прибавляют в кювету с образцом (1 мл), смесь тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре (25 °С).

2) В контрольном опыте готовят смесь, состоящую из 0,03 *М* ТНБС в 0,1 *М* борате (1 мл).

3) Определяют поглощение при 420 нм.

1.8. Определение алкиламиногрупп, присоединенных к CNBr-активированной агарозе

Для определения нуклеофильности различных соединений обычно используются *п*-нитрофениловые эфиры. Так, 1,6-диаминогексан вызывает отщепление двух эквивалентов *п*-нитрофенолята от *п*-нитрофенилового эфира. При концентрациях 1,6-диаминогексана меньших, чем концентрации эфира, до отношения эфир÷диамин=2, скорость отщепления *п*-нитрофенолята от эфира подчиняется кинетике псевдопервого порядка по диамину. После того как прореагировал весь диамин, можно установить его концентрацию экстраполяцией скорости спонтанного гидролиза к начальному моменту времени. Эта методика определения концентрации амина может быть также применена к диамину, иммобилизованному на сефарозе.

1.8.1. Методика.

1) Образец геля с иммобилизованным диамином (50—200 мг) промывают 0,25 *М* боратным буфером (рН 8,5) и переносят в микропробирку Эппендорфа (объем 1 мл), в которой находится маленький магнитик для перемешивания на магнитной мешалке.

2) Тем же буфером доводят объем до 0,22 мл и добавляют 0,1 *М* *п*-нитрофенилацетат в ацетонитриле (0,2 мл) (начало отсчета времени).

3) Суспензию перемешивают при комнатной температуре, отбирая пробы (аликвоты) по 10 мкл приблизительно через каждые 10 мин в течение 2 ч.

4) Пробы разбавляют ледяным 0,05 *М* боратным буфером (рН 8,75; 5 мл) и быстро измеряют поглощение при 400 нм.

5) К оставшейся суспензии добавляют 2,5 М NaOH (5 мкл), отбирают последнюю пробу и после соответствующей подготовки (пункт 4) также измеряют оптическую плотность при 400 нм.

Поглощение, измеренное для последней пробы, дает содержание аминогрупп в образце. Проводят контрольные опыты с используемым буфером и необработанной агарозой.

2. ОТЩЕПЛЕНИЕ ЛИГАНДА

Для систем с высоким сродством (например, в которых осуществляется взаимодействие гормон — рецептор) существует серьезное ограничение в применении аффинной хроматографии. Выделение пикомолярных и наномолярных количеств белков осложняется относительно легким отщеплением аффинных лигандов в раствор. Эти проблемы исторически возникли в первую очередь ввиду того, что аффинные лиганды связывались моновалентно через вставку с бромцианактивированной агарозой в присутствии соединений (например, буферов и белков), содержащих нуклеофилы.

Для более подробного изучения отщепления аффинных лигандов от специфических адсорбентов Тессер и др. [3] получили адсорбенты присоединением аденозин-3',5'-цикломонофосфата и других веществ через различные вставки к агарозе, целлюлозе и поперечно-сшитому декстрану посредством бромциан-активации и к полиакриламиду через амидную связь, образованную карбоксильными группами носителя, в соответствии с методом, описанным Инманом и Динцисом [4]. Исследование зависимости количества отщепленных лигандов от pH и времени позволило установить, что отщепление «аффинантов» от матриц происходит преимущественно в месте присоединения к поверхности твердого носителя, а степень отщепления увеличивается при участии соседних карбоксильных и карбоксиамидных групп в полиакриламидных гелях и гидроксильных групп в агарозе, целлюлозе и поперечно-сшитых декстранах. Реакция отщепления носит общий характер и не зависит от структуры связанного аффинного лиганда. Лиганды, присоединенные к полиакриламидным гелям посредством R-NH-CO-акриламидных связей, отщепляются более медленно.

Отщепление связанных лигандов можно подавить при использовании поливалентных вставок. Дальнейшее улучшение может быть достигнуто присоединением лигандов к носителю более прочными связями, такими, как в методе периодатного окисления или через эпоксидактивированную агарозу. Была изучена зависимость степени отщепления от используемого носителя. При выделении рецепторов эстрогенов и инсулина, на-

пример, неприемлемы сорбенты на основе стеклянных и полиакриламидных носителей ввиду быстрого отщепления аффинных лигандов.

3. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИГАНДОВ

Впервые влияние концентрации лиганда на связывание ферментов с аффинными лигандами было исследовано в работе Харвея с сотр. [5], где было изучено поведение различных ферментов по отношению к иммобилизованному аденозин-5′-монофосфату (5′-АМР).

Для полимеров с различной концентрацией иммобилизованного лиганда, однородно распределенного по гелю, связывание фермента, например лактатдегидрогеназы, зависит от концентрации лиганда таким же образом, как и при непосредственном разбавлении аффинного геля незамещенной сефарозой. Более сильное связывание, наблюдаемое с гетерогенными полимерами, отражает, возможно, способ разбавления, так как в этих условиях могут сохраняться участки на колонке, в которых концентрация лиганда все еще остается равной концентрации первоначального неразбавленного геля.

Емкость колонки с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой по лактатдегидрогеназе при использовании гелей с различными концентрациями ковалентно связанного лиганда меняется по сигмоидальной кривой в зависимости от концентрации лиганда. Эта зависимость отличается от поведения гелей, полученных прямым разбавлением первоначального геля немодифицированной сефарозой (рис. 1). При низких концентрациях лиганда глицерокиназа не связывается с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой. Сигмоидальный характер кривой отражает определенную кооперативность во взаимодействии фермента с иммобилизованным лигандом и подтверждает, что при более высоких концентрациях лиганда удерживание фермента на геле происходит благодаря затруднению его диссоциации с матрицы.

Концентрация лиганда может быть использована для тонкого регулирования связывания макромолекулы с аффинной колонкой. Концентрация лиганда, выбранная на основании отдельного эксперимента, вероятнее всего, не будет оптимальной для достижения наилучшего разделения. Это особенно относится к адсорбентам, содержащим фенилборную кислоту. В этих случаях должны быть поставлены несколько экспериментов с различными концентрациями лиганда для окончательного решения вопроса об условиях разделения.

4. ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРОВ КОЛОНКИ

Лове и сотр. [6] исследовали влияние размера колонки на связывание ряда ферментов с иммобилизованным на сефарозе 5′-АМР. При этом работа проводилась в колонках, содержащих

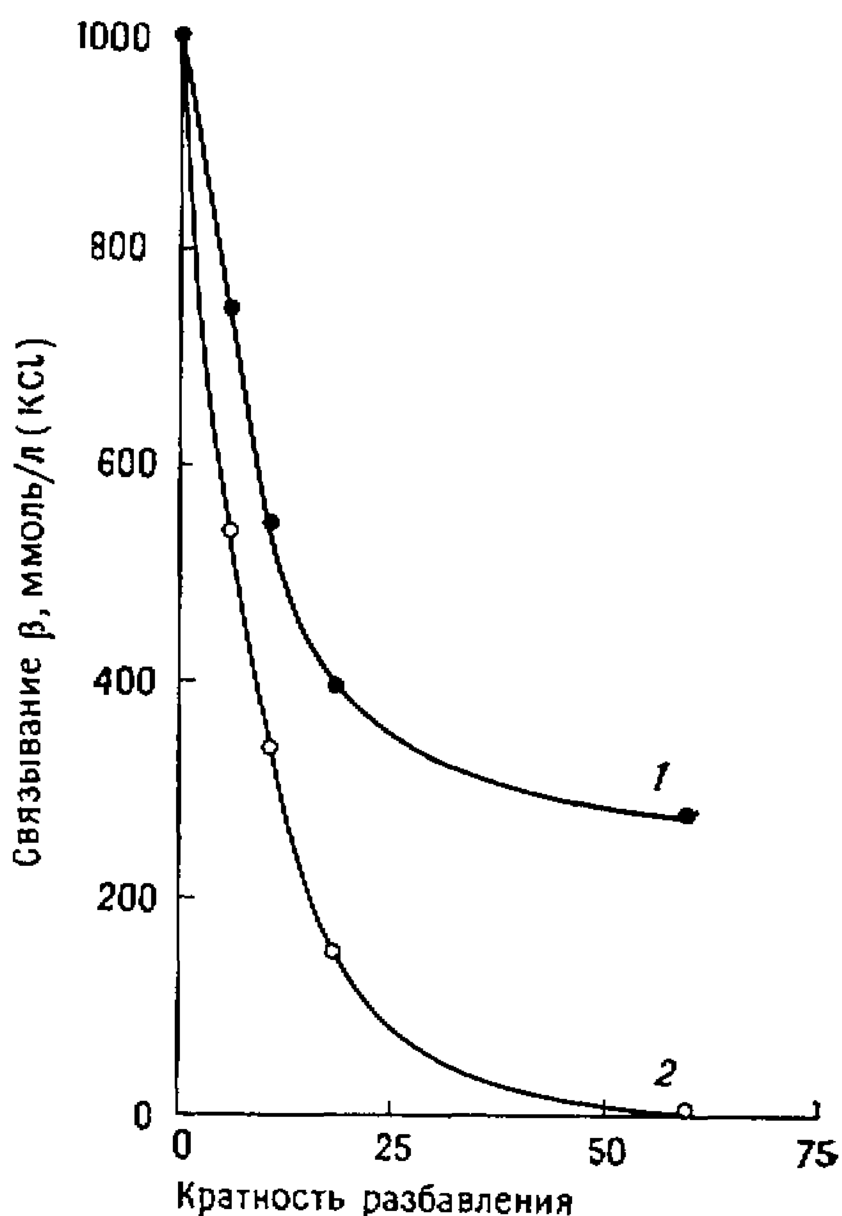


Рис. 1. Связывание лактатдегидрогеназы из сердца свиньи с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой в зависимости от концентрации лиганда. Образцы (100 мкл) содержали фермент с активностью 5 Е и 1,5 мг бычьего сывороточного альбумина. *1* — N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефароза, разбавленная незамещенной сефарозой до требуемых концентраций лиганда; *2* — N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР, однородно присоединенный к сефарозе 4В с указанной концентрацией лиганда. Нулевое разбавление эквивалентно концентрации лиганда 1,5 мкмоль 5′-АМР/мл сефарозы. Прочность связывания β оценивалась по концентрации KCl (ммоль/л), необходимого для элюирования фермента. (Воспроизведено с разрешения.)

один и тот же сорбент с постоянной концентрацией на нем лиганда, а также при постоянном суммарном количестве лиганда в колонке; менялась только длина упакованного геля (увеличивалась в 60 раз путем 4-кратного уменьшения диаметра колонки). Была изучена зависимость удерживания ферментов в колонке от длины (высоты) колонки. На рис. 2 показано, что при увеличении длины колонки с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой связывание дрожжевой алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы достигает максимального (предельного) значения.

При графическом представлении экспериментальных данных по элюированию в обратных координатах наблюдаются два максимума при концентрации KCl в элюенте 830 и 420 ммоль/л; половинное (от максимального) связывание в случае дрожжевой алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы соответствует длине колонки 25 и 15 мм.

5. ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ПОТОКА И ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ

С использованием одного и того же аффинного адсорбента АМР-агарозы в работе [6] изучено также влияние скорости потока и времени инкубации на связывание лактатдегидрогеназы при низкой концентрации фермента (0,6 Е/мл). На рис. 3 показано, что в условиях бетч-процесса имеет место быстрое уве-

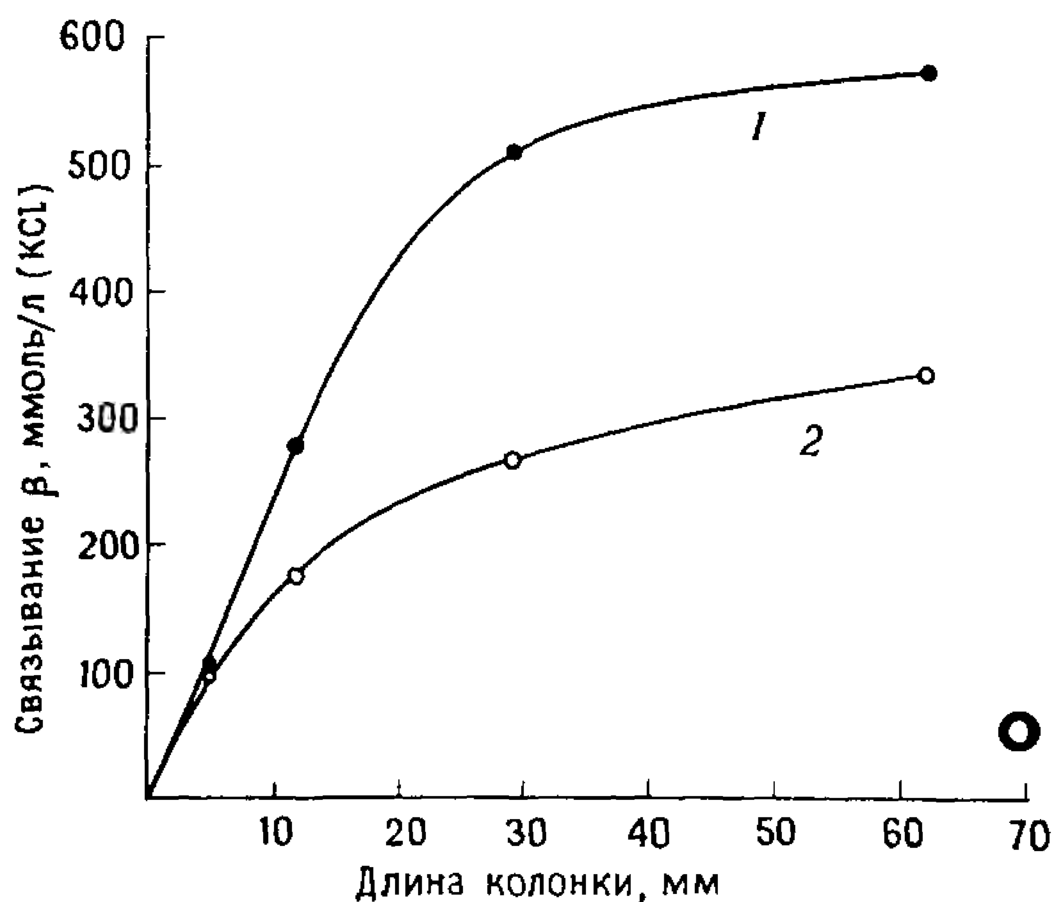


Рис. 2. Влияние длины колонки при постоянных концентрации и содержании лиганда на связываиие двух ферментов с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой. Образец (100 мкл), содержащий фермент (5Е) и бычий сывороточный альбумин (1,5 мг), наносили на колонки (различных диаметров: 6, 9, 13,5 и 23 мм) с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой (2,0 г влажного носителя, 1,5 мкмоль 5′-АМР/мл). Связывание β оценивалось как концентрация KCl (ммоль/л) в центре пика фермента при его элюировании линейным градиентом KCl. Бычий сывороточный альбумин, который элюировали уравновешивающим буфером, дрожжевую алкогольдегидрогеназу (*1*) и глицерокиназу (*2*) анализировали методами, указанными в работе [6].

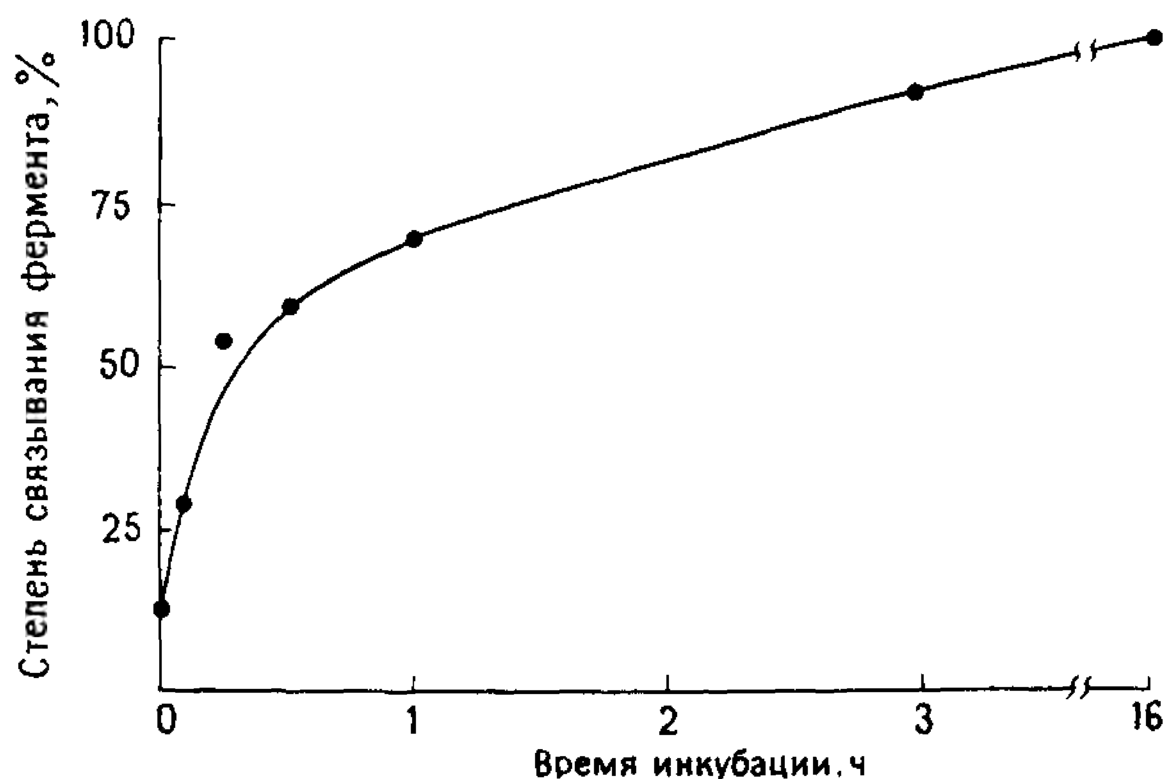


Рис. 3. Влияние времени инкубации на емкость N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозы по лактатдегидрогеназе в условиях бетч-процесса [6]. (Воспроизведено с разрешения.)

личение процента связывания фермента в начальный период времени с последующим плавным ростом до 100%-ного связывания, причем время 50%-ного связывания составляет 20 мин. При изучении адсорбента в колоночных условиях при более низкой концентрации лиганда наблюдается аналогичное влияние времени уравновешивания. Когда глицерокиназа и лактатдегидрогеназа уравновешиваются с адсорбентом в течение 67 ч,

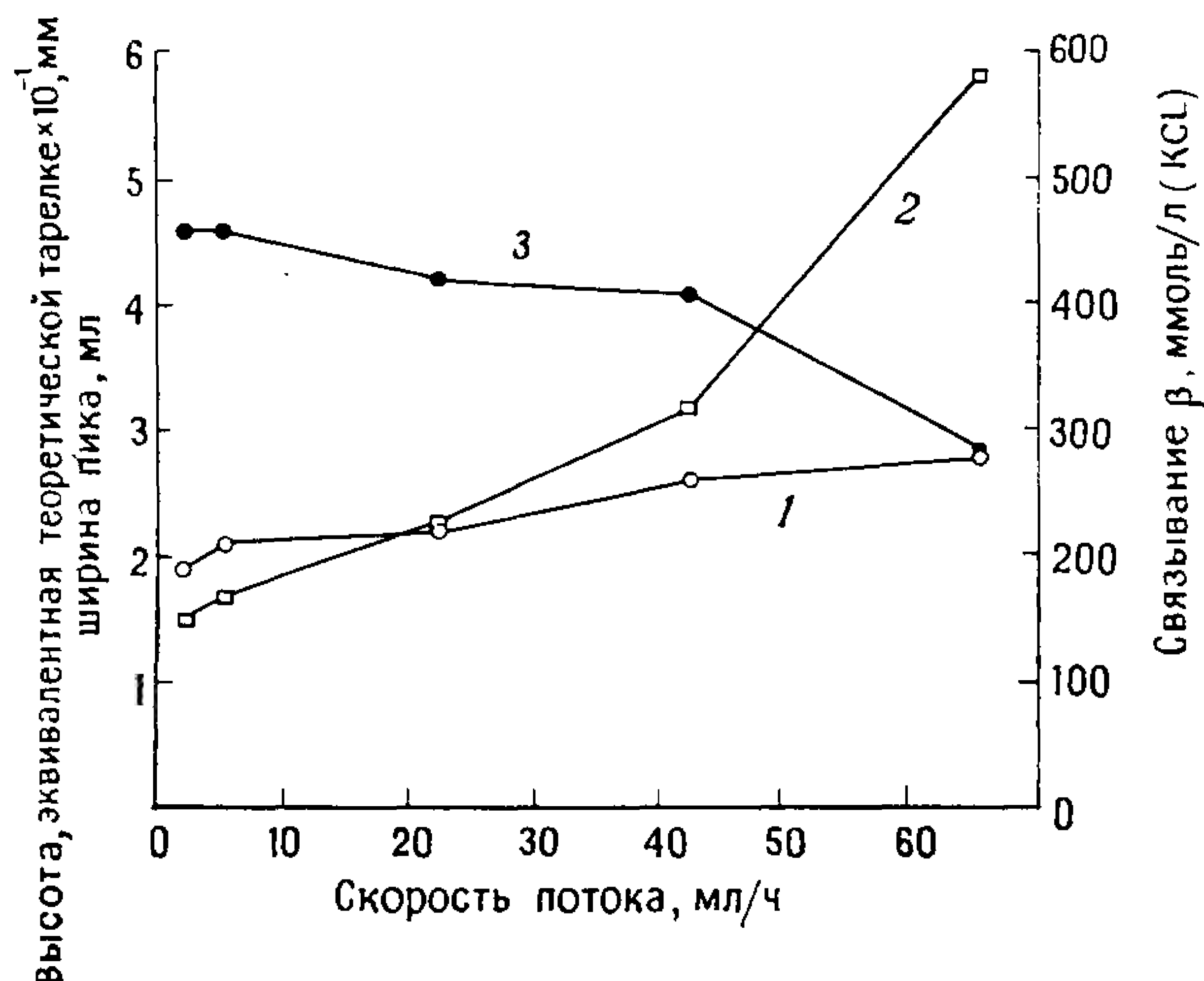


Рис. 4. Связывание лактатдегидрогеназы с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой в зависимости от скорости потока. Образец фермента (100 мл), содержащий 5 Е лактатдегидрогеназы и 1,5 мг бычьего сывороточного альбумина, наносили на колонку (34×5 мм) с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой (0,95 г влажного носителя, 0,125 мкмоль 5′-АМР/мл). *1* — изменение ширины пика (10^{-1}, мл) в зависимости от скорости тока, определенное по основанию пика; *2* — высота (мм), эквивалентная теоретической тарелке, измеренная, как описано в работе [6]; *3* — прочность связывания β оценивалась, как указано в подписи к рис. 1 [6]. (Воспроизведено с разрешения.)

то эффективность колонки и прочность связывания фермента увеличиваются со временем. В случае глицерокиназы также увеличивается процент связывания фермента. Было также изучено влияние скорости потока на связывание лактатдегидрогеназы с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой в колоночном процессе. Из рис. 4 видно, что эффективность колонки, оцениваемая как высота, эквивалентная теоретической тарелке, а также прочность связывания фермента уменьшаются при высоких скоростях потока. Влияние скорости потока сильнее проявляется на коротких колонках, где часть ферментативной активности элюируется в исключающемся объеме. Концентрация инертного белка (бычьего сывороточного альбумина) не оказывает влияния даже при высоких скоростях потока (67 мл/ч).

Меньший эффект скорости потока наблюдается для пленочных носителей (рис. 5) [7]. Влияние скорости потока также менее заметно в случае взаимодействий лиганд — макромолекула с высокими константами ассоциации. Однако в некоторых системах с высоким сродством (например, иммуноглобулин — антиген) может иметь место необратимое связывание, если белки контактировали с гелем в течение длительного времени. Как правило, с колонкой следует работать настолько быстро, на-

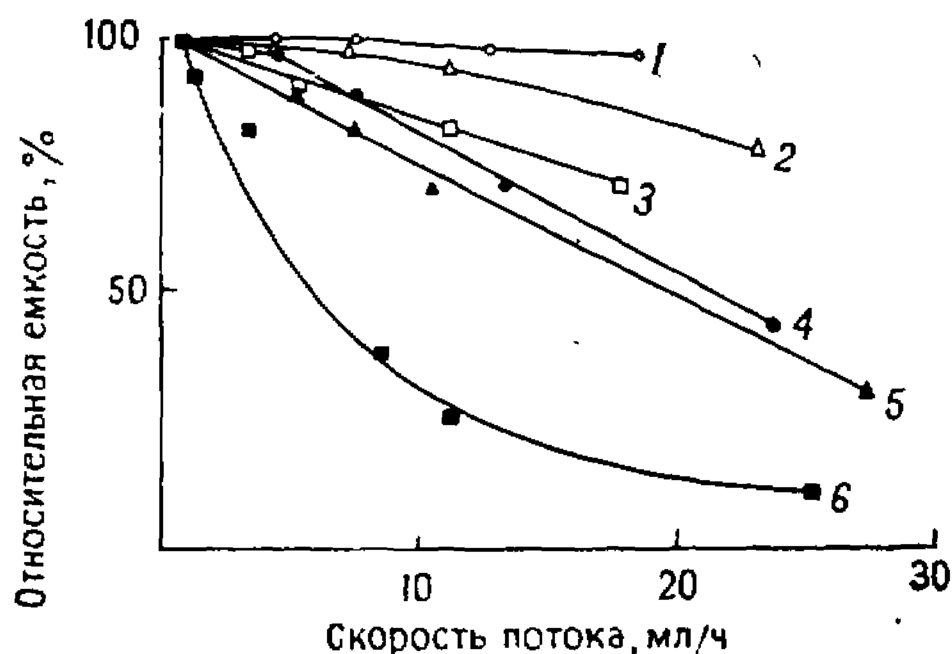


Рис. 5. Зависимость емкости от скорости потока для пленочных носителей по сравнению с таковой для агарозы. *1÷3* — лиганды иммобилизованы на матрексе 201 R; *4÷5* — лиганды иммобилизованы на сефарозе. Ферменты: *1*, *4* — дигидрофолатредуктаза из *Lactobacillus casei*; *2* и *5* — изоцитратдегидрогеназа из сердца свиньи; *3* и *6* — глутаматдегидрогеназа из *Neurospora crassa* [7]. (Воспроизведено с разрешения.)

сколько позволяет константа ассоциации системы K_a. Как отмечено выше, влияние времени инкубации на процесс адсорбции легко изучать в бетч-процессе. На рис. 3 представлена зависимость емкости N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозы по лактатдегидрогеназе от времени инкубации в условиях бетч-процесса. Для получения этих данных можно предложить следующую методику эксперимента [6].

1) Влажную N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозу (0,5 г; 1,5 мкмоль 5′-АМР/мл) суспендируют в 10 мМ калийфосфат-КОН-буфере (pH 7,5; 100 мл), содержащем лактатдегидрогеназу (10 Е фермента из сердца свиньи).

2) Смесь инкубируют в условиях бетч-процесса на роллерном смесителе при 4,5 °С.

3) Через определенные интервалы времени роллер останавливают, дают гелю осесть (15 мин) и отбирают пробу.

4) Определяют активность лактатдегидрогеназы, измеряют объем жидкой фазы над гелем и рассчитывают количество связавшегося фермента.

6. ВЛИЯНИЕ pH И ТЕМПЕРАТУРЫ

Значительное влияние на многие биоспецифические взаимодействия оказывает изменение pH и температуры. В случаях когда связывание фермента проявляет заметную pH-зависимость (не совпадающую с pH-оптимумом активности), можно ожидать, что кривые элюирования с аффинной колонки будут обнаруживать эту pH-зависимость.

Подобная взаимосвязь наблюдается и при исследовании влияния температуры. Гидрофобные взаимодействия ослабляются при понижении температуры, в связи с чем при наличии на сорбенте гидрофобных вставок изменение температуры может вызывать соответствующие изменения в силе взаимодействия выделяемого биополимера с сорбентом. При необходимости можно использовать сверхнизкую температуру [8, 9].

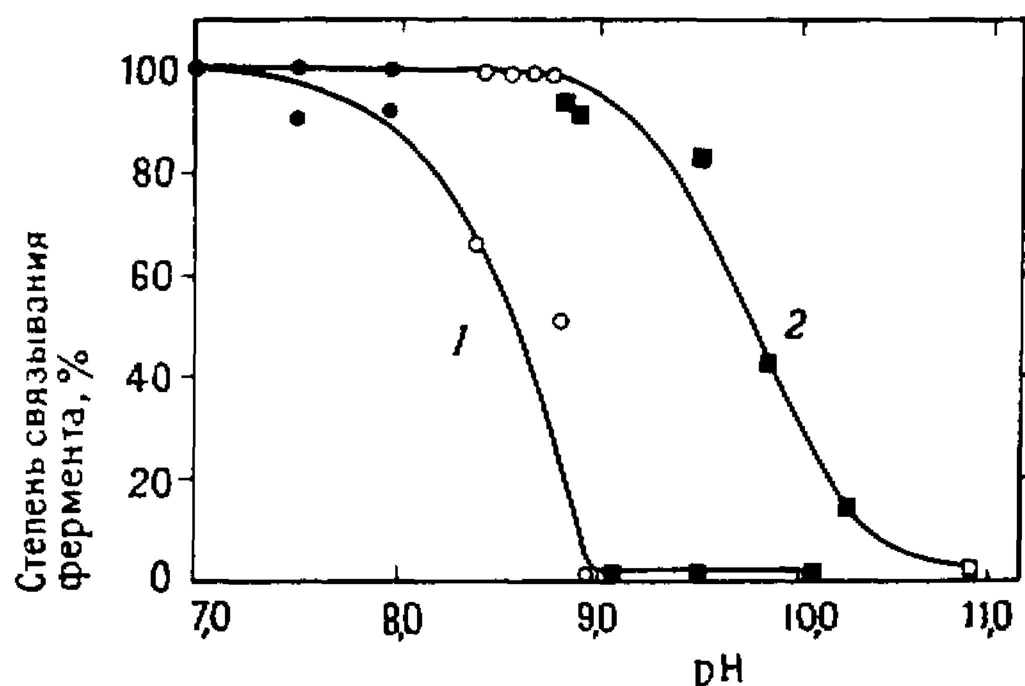


Рис. 6. Влияние pH на связывание лактатдегидрогеназы с 6-аминогексаноил-NAD-сефарозой (*1*) и N^6-(6-аминогексил)-5′-AMP-сефарозой (*2*) [10]. (Воспроизведено с разрешения.)

6.1. Влияние pH

Изучение влияния pH и температуры проведено на адсорбентах, специфичных к группе ферментов [10, 11]. Влияние pH на связывание лактатдегидрогеназы из сердечной мышцы с двумя аффинными адсорбентами представлено на рис. 6. Взаимодействие фермента с обоими адсорбентами явно не зависит от концентрации ионов водорода в растворе вплоть до pH 8, но в более щелочной области наблюдалась зависимость от природы адсорбента. В случае 6-аминогексаноил-NAD^+-сефарозы поведение фермента характеризовалось кажущейся константой p$K \approx 8{,}5$, в то время как для N^6-(6-аминогексил)-5′-AMP-сефарозы p$K \approx 9{,}7$. Различия между значениями кажущихся констант pK, определенных для двух иммобилизованных

нуклеотидов, возможно, отражают влияние адсорбента на взаимодействие, так как при неполном взаимодействии NAD с 6-аминогексаноил-сефарозой на матрице могут оставаться заряженные группы.

Процент связывания глицерокиназы с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой уменьшается при значениях pH>7,0; кажущаяся константа $pK \approx 8$. Кроме того, прочность связывания фермента с иммобилизованным лигандом совпадает с соответствующей pH-зависимостью. Уменьшение связывания при изменении pH наблюдалось при взаимодействии лактатдегидрогеназы с 6-аминогексаноил-NAD-сефарозой. В идентичных условиях в исследованной области pH бычий сывороточный альбумин не проявлял сродства к этому адсорбенту.

Известно несколько примеров хроматографии на иммобилизованных красителях, когда увеличение pH элюирующего буфера ослабляет связывание белков с адсорбентом. Так, иммобилизованный цибакрон голубой 3G-A при более высоких pH связывает белки плазмы крови менее жестко [12]. При pH 5,0 95% белков связывается на колонке, в то время как при pH 9,0 связывается только 40% белков (главным образом альбумин). Значения pH, при которых различные белки плазмы выходят с колонки, не коррелируют с изоэлектрическими точками белков, указывая, что для процесса элюирования важны специфические участки поверхности, а не суммарный заряд белка. Однако отсутствие подобных корреляций наблюдается не всегда; так, связывание 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из *Bacillus stearothermophilus* с сефарозой с иммобилизованным цибакроном голубым уменьшается при pH<6,5 или увеличивается при pH>8,5 [13].

С уменьшением pH могут происходить изменения в механизме связывания. Так, при использовании колонок с иммобилизованным фенилборонатом при pH<8,0 возникают затруднения по количественному разделению HbA_1c и HbA, поскольку при этом pH имеет место гидрофобное взаимодействие, вызывающее неспецифическое связывание с колонкой HbA [14].

Для оптимизации разделений, основанных на биоспецифическом сродстве, важно изучить pH-зависимость связывания индивидуальных белков на колонке в максимально возможном интервале pH.

6.2. Влияние температуры

Температура оказывает заметное влияние на емкость аффинных колонок. При повышенных температурах уменьшается степень удерживания дрожжевой алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы на N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозе. Однако глицерокиназа может количественно связываться при этих по-

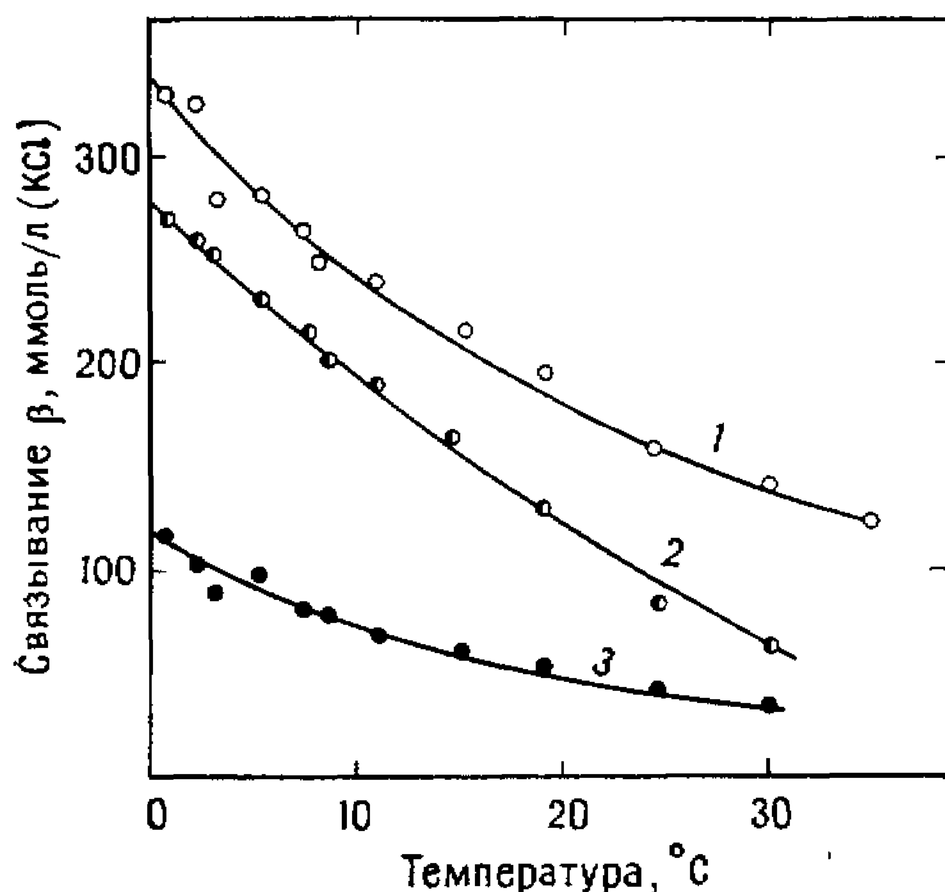


Рис. 7. Влияние температуры на связывание дрожжевой алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой. Концентрация АМР (мкмоль/л): *1* и *2* — 1,5; *3* — 4,0 [11]. (Воспроизведено с разрешения.)

вышенных температурах при увеличении концентрации иммобилизованного лиганда до 4 мкмоль 5′-АМР/мл сефарозы. На рис. 7 показано, что при обеих концентрациях лиганда прочность связывания (оцениваемая концентрацией соли, соответствующей пику элюирования фермента) между иммобилизованным лигандом и ферментами уменьшается при повышенных температурах.

Лактатдегидрогеназа настолько прочно связывается с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой, что не может быть элюирована 1,0 М KCl при 40 °С. Однако элюирование можно осущест-

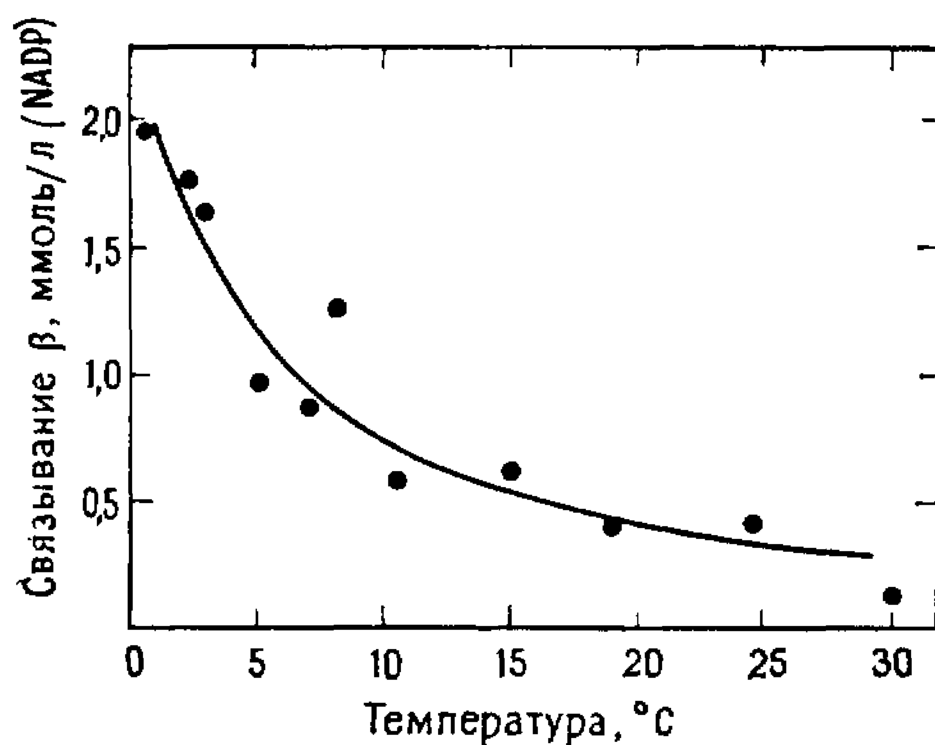


Рис. 8. Влияние температуры на связывание лактатдегидрогеназы с N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР-сефарозой [11]. (Воспроизведено с разрешения.)

вить при использовании линейного градиента NADH. Из рис. 8 видно, что концентрация NADH, требуемая для элюирования фермента, также уменьшается с повышением температуры. При повышенных температурах сродство фермента к иммобилизованному лиганду, как правило, уменьшается.

7. ИОННАЯ СИЛА

Электростатические взаимодействия играют важную роль в связывании ферментов на аффинных колонках, поскольку увеличение ионной силы (увеличение концентрации соли в элюирующем буфере) обычно приводит к десорбции связанных ферментов с аффинных адсорбентов различных типов. Однако для некоторых ферментов в присутствии соли увеличивается прочность связывания, например, в результате гидрофобных взаимодействий, обусловливающих сорбцию интерферона фибробластов [15], интерферона кролика [16] и изоцитратдегидрогеназы из сердца человека [17] на иммобилизованном цибакроне голубом 3-GA. В таких случаях при увеличении ионной силы элюента белки не элюируются с колонки и для их десорбции необходимо применение таких элюентов, как 50%-ный (об./об.) этиленгликоль.

Таблица 1. Влияние ионной силы трех буферов на связывание глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы с гелем матрекс оранжевый B[18]. (Воспроизведено с разрешения.)

Ионная сила, ммоль/л	Трис-HCl-буфер		Триэтаноламин-NaOH-буфер		Фосфатный буфер	
	Электропроводность, мСм	Степень связывания, %	Электропроводность, мСм	Степень связывания, %	Электропроводность, мСм	Степень связывания, %
10	0,6	0	0,75	9	1,46	89
20	0,87	53	1,38	100	2,55	100
30	1,28	89	2,00	100	3,65	100
40	1,60	100	2,65	100	4,60	100
50	1,95	100	3,25	100	6,00	100
70	2,52	100	4,40	100	7,80	100
100	3,66	100	5,80	100	10,70	100
150	5,60	100	7,80	100	15,00	100
200	6,70	100	10,80	86	19,00	100
300	11,0	93	15,50	19	28,0	100
400	12,70	69	17,50	9	35,20	100
500	14,60	14	21,20	0	41,40	100
550	16,50	0	Не исследовалось	Не исследовалось	Не исследовалось	Не исследовалось
750	19,00	0	19,50	0	53,00	87
1000	22,30	0	35,5	0	64,00	83

Ниже описана методика эксперимента, показывающего влияние соли на связывание глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *Leuconostos mesenteroides* на колонке с гелем матрекс оранжевый В в трех буферах(трис-HCl, триэтаноламин/NaOH и фосфатный) при различной ионной силе [18].

1) Упаковывают несколько колонок (1 мл, 2,3×0,7 см) с иммобилизованным красителем (концентрация лиганда 5,5 мг/г геля) и уравновешивают их буферными растворами различной концентрации (табл. 1) (pH 7,8; ионная сила меняется в интервале 10 ммоль/л÷1,0 ммоль/л).

2) На каждую колонку наносят 100 мкл (5,5 Е) очищенного фермента (184 Е/мг), диализованного против соответствующего буфера.

3) Промывают колонку уравновешивающим буфером (5 мл) и собирают элюат в виде одной фракции.

4) Связавшийся фермент элюируют во вторую фракцию при промывании колонки уравновешивающим буфером, содержащим 1,0 М KCl (5 мл); также собирают элюат в одну фракцию.

5) Определяют ферментативную активность каждой фракции и рассчитывают степень связывания фермента (в процентах).

8. МЕТОДЫ ДЕСОРБЦИИ

8.1. Конкурентное элюирование лигандом

Большинство замечаний относительно элюирования свободным лигандом касаются также ингибиторов и аллостерических модификаторов. Для проведения конкурентного элюирования свободным лигандом важным параметром во всех случаях является концентрация иммобилизованного лиганда. Если концентрация последнего чрезмерно велика, то в случае систем с высоким сродством возникают трудности при применении этого метода элюирования (разд. 3).

Элюирование буфером, содержащим свободный лиганд, является идеальным методом, но иногда такой путь может оказаться дорогостоящим. Часто экспериментаторы используют элюенты с довольно высокими концентрациями лиганда; это обусловлено тем, что в конкретных условиях применения данного буфера взаимодействие вещества с колонкой настолько сильно, что необходима высокая концентрация элюирующего лиганда. Если для ослабления взаимодействия вещества с адсорбентом вначале изменяют элюирующий буфер, то затем можно использовать для элюирования более низкую концентрацию свободного лиганда. Тщательный подбор концентраций иммобилизованного лиганда и элюирующего лиганда приводит к улучшению результатов десорбции и более экономичному рас-

ходу лиганда. Концентрацию элюирующего лиганда можно легко установить путем пропускания растворов с линейным градиентом свободного лиганда и определения концентрации лиганда, соответствующей максимуму пика десорбции данной макромолекулы.

При проведении аффинного элюирования необходимо учитывать некоторые аспекты взаимодействия лиганд — макромолекула. Увеличение концентрации соли может значительно уменьшить биоспецифическое взаимодействие, но может также ослабить последующее взаимодействие со свободным лигандом при аффинном элюировании. Увеличение концентрации соли уменьшает неспецифические ионные взаимодействия, но может также усиливать гидрофобные взаимодействия, особенно при наличии на сорбенте полиметиленовых вставок. Если важную роль при связывании играют гидрофобные взаимодействия, то более эффективным может быть уменьшение концентрации соли. Кроме того, можно использовать изменение pH или введение агентов, уменьшающих поверхностное натяжение (для ослабления гидрофобных и вандерваальсовых взаимодействий). В качестве последних могут применяться неионный детергент, такой, как тритон Х-100 до 1%-ной (об./об.) концентрации в буфере, этиленгликоль [10—50% (об./об.)] или относительно небольшие количества этанола [до 5% (об./об.)]. Маловероятно, чтобы эти вещества могли вызывать изменения константы ассоциации с заряженными лигандами. После предварительного уравновешивания колонки указанным буфером в него вводят лиганд для аффинного элюирования. Очевидно, могут быть использованы также аллостерические модифицирующие агенты или ингибиторы взаимодействия лиганд — макромолекула, причем приведенное выше обсуждение по применению свободного лиганда полностью относится и к указанным агентам.

8.2. Элюирование коферментами

В работе [18] исследовалась способность ряда биоспецифических элюентов десорбировать глюкоза-6-фосфат- и глутаматдегидрогеназы, связанные с иммобилизованными триазиновыми красителями. Ниже приводятся данные для первого фермента.

В табл. 2 приведены результаты элюирования глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *L. mesenteroides*, связанной с гелем матрекс оранжевый В. В случае эффективного биоспецифического элюирования фермент вымывался в виде резкого пика. Когда же биоспецифическое элюирование оказывалось неэффективным, количественное элюирование достигалось пульсирующим введением 50 мкМ $NADP^+$. В табл. 3 приведены данные по очистке с использованием эффективных биоспецифических элюен-

Таблица 2. Исследование ряда биоспецифических элюентов для десорбции глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *L. mesenteroides*, связанной с гелем матрекс оранжевый В

Биоспецифический элюент	Концентрация, ммоль/л	Степень элюирования фермента (от нанесенного количества), %
$NADP^+$	1	85
$NADP^+$	0,1	80
$NADP^+$	0,05	78
$NADP^+$	0,01	13
NAD^+	1	11
NAD^+	10	74
NADPH	1	83
NADH	1	4
Глюкоза-6-фосфат	1	7
Тетранатрийпирофосфат	1	0
Тетранатрийпирофосфат	10	0
6-Фосфоглюконат	1	0
2′, 5′-ADP	1	95
2′, 5′-ADP	0,05	6
3′, 5′-ADP	1	0
2′-AMP	1	0
3′-AMP	1	0
5′-AMP	1	0
5′-AMP	1	0
5′-ATP	1	3
Никотинамидмононуклеотид	1	0
Пиридоксаль-5′-фосфат	1	5
Глюкоза-6-фосфат+NADH	1	8
6-Фосфоглюконат+NADH	1	0
Тетранатрийпирофосфат+NADH	1	0
Глюкоза-6-фосфат+NAD^+	1	0
Пиридоксаль-5′-фосфат+NAD^+	1	14

Таблица 3. Обзор данных по эффективному биоспецифическому элюированию глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *L. mesenteroides* с колонок с иммобилизованными процеоном красным НЕ-3В, цибакроном голубым 3-GA, а также с гелем матрекс оранжевый В

Элюент	Процион красный НЕ-3В		Цибакрон голубой 3-GA		Гель матрекс оранжевый В	
	Степень очистки	Выход, %	Степень очистки	Выход, %	Степень очистки	Выход, %
1 мМ $NADP^+$	16	73	15	82	28,2	85
10 мкМ $NADP^+$	—	—	—	—	29,9	80
50 мкМ $NADP^+$	11	59	11	19	40,3	78
1 мМ NADPH	12	70	11	67	38,4	83
10 мМ NAD^+	—	—	—	—	39,1	74
1 мМ 2′, 5′-ADP	8	63	9	70	21,6	95
1 мМ G-6-P+1 мМ NADH	5	30	5	28	—	—

тов: $NADP^+$ (1,0, 0,1 и 0,05 мМ), NAD^+ (10 мМ), NADPH (1 мМ) и 2′,5′-ADP (1 мМ). Из многих исследованных элюентов лишь несколько оказались эффективными. Так, оба кофермента NAD^+ и $NADP^+$, используемые этим специфичным по отношению к двум нуклеотидам ферментом, а также NADPH и 2′,5′-ADP десорбировали очищенный фермент. Субстрат и продукт ферментативной реакции (т. е. глюкоза-6-фосфат и 6-фосфоглюконат) были неэффективными при исследованных концентрациях.

8.3. Изменение ионной силы

Исторически сложился следующий экспериментальный прием: для элюирования использовались буферы с увеличивающейся ионной силой. Незначительные экономические затраты являются весьма веским преимуществом такого метода элюирования. Во многих работах для увеличения ионной силы описано использование KCl или NaCl. Эффективность использования различных солей для элюирования с иммобилизованных красителей и, возможно, с других аффинных колонок оценивалась с помощью коэффициентов вязкости *B*. С помощью предлагаемых в работе [19] таблиц можно изменять ионную силу элюента в соответствии с пиком элюирования белка; таким образом можно влиять на кривые элюирования, меняя состав и концентрацию соли.

8.4. Изменение растворителя

На связывание макромолекул можно повлиять изменением растворителя. Например, для изменения условий были использованы этиленгликоль и другие спирты; эти эксперименты проводились при разных температурных условиях, в частности при низких температурах (разд. 6) (см. также разд. 8.9). Ниже приведено описание такого эксперимента с использованием этиленгликоля.

1) Колонку (2 мл) с иммобилизованным проционом желтым MX-3R (концентрация лиганда 17,2 мг/г геля) уравновешивают 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,8).

2) Наносят образец (1 мл, 32,2 Е, 8,8 мг) частично очищенной глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы.

3) Колонку промывают уравновешивающим буфером при скорости потока 4 мл/ч и отбирают фракции по 1 мл до тех пор, пока поглощение элюента при 280 нм не станет ниже 0,05.

4) Наносят пульсирующую дозу (10 мл) 50%-ного (об./об.) этиленгликоля в уравновешивающем буфере, после чего через колонку вновь пропускают уравновешивающий буфер.

5) Все фракции контролируют по поглощению при 280 нм и анализируют на ферментативную активность.

6) Фракции объединяют и определяют выход и степень очистки.

8.5. Элюирование путем изменения температуры

В работе [11] показано, что изменение температуры можно использовать с целью элюирования ферментов с аффинных адсорбентов. На рис. 9 приведены результаты разделения дрожжевой алкогольдегидрогеназы, глицерокиназы, гексокиназы и лактатдегидрогеназы на иммобилизованном 5′-AMP с использованием линейного градиента температуры. Уместно заметить, что глицерокиназа и дрожжевая алкогольдегидрогеназа элюируются в порядке, соответствующем их кажущимся энергиям адсорбции с почти количественным выходом (70—90%), в то время как для элюирования лактатдегидрогеназы даже при

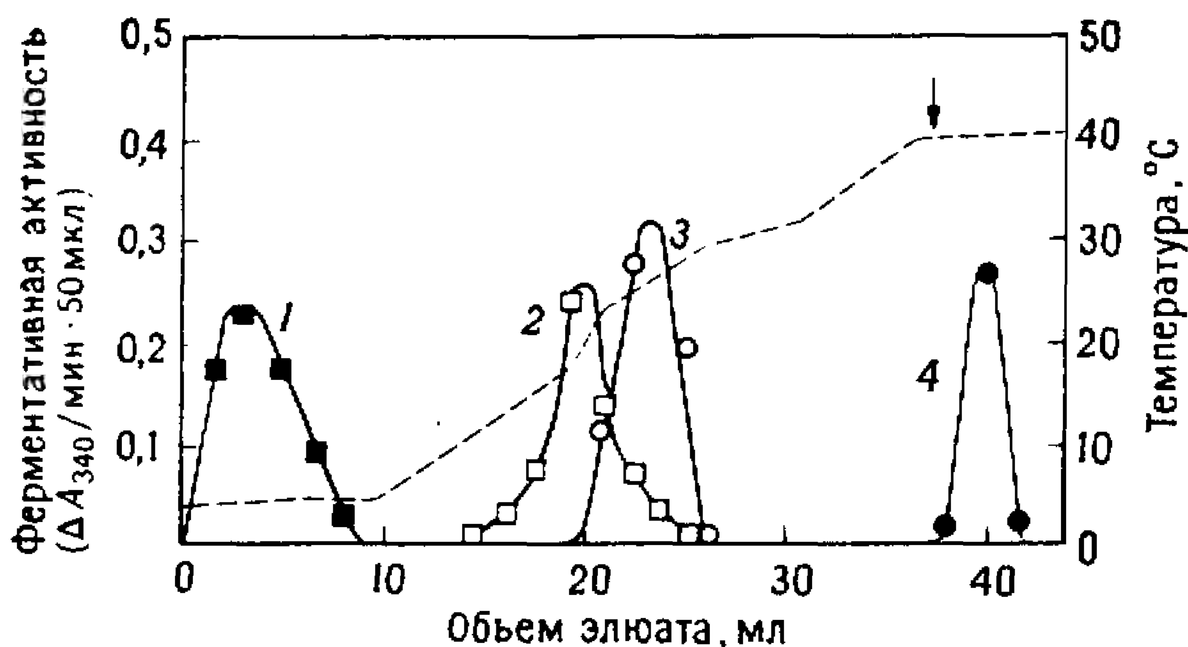


Рис. 9. Разделение различных ферментов на N^6-(6-аминогексил)-5′-AMP-сефарозе с использованием увеличивающегося градиента температуры. 1 — гексокиназа; 2 — глицерокиназа; 3 — дрожжевая алкогольдегидрогеназа; 4 — лактатдегидрогеназа H_4. Стрелка указывает элюирование пульсирующей дозой 5 мМ NADH [11]. (Воспроизведено с разрешения.)

40 °С все еще требуется введение пульсирующей дозы 5 мМ NADH.

Таким образом, изменение температуры в сочетании с другими приемами, такими, как уменьшение концентрации лиганда, пульсирующее введение NADH или использование градиентов ионной силы, можно применять при элюировании жестко связанных ферментов. Кроме того, градиенты температуры могут служить очень чувствительными методами элюирования слабо связанных ферментов. Добавим, что элюированные ферменты, не содержащие десорбирующих агентов (например, солей или незначительных количеств нуклеотида), можно непосредственно использовать при кинетических исследованиях.

8.6. Изменение буфера и/или pH

Иногда совершенно неожиданно полученные результаты можно использовать в практических целях. Так, факт, что для связывания глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы с гелем матрекс оранжевый В требуются определенные ионы, привел к разработке удобного препаративного метода очистки этого фермента.

1) Колонку (2 мл, 3,0×0,8 см) с гелем матрекс оранжевый В (концентрация лиганда 17,2 мг/г геля) уравновешивают 50 мМ трис-HCl буфером, pH 7,8.

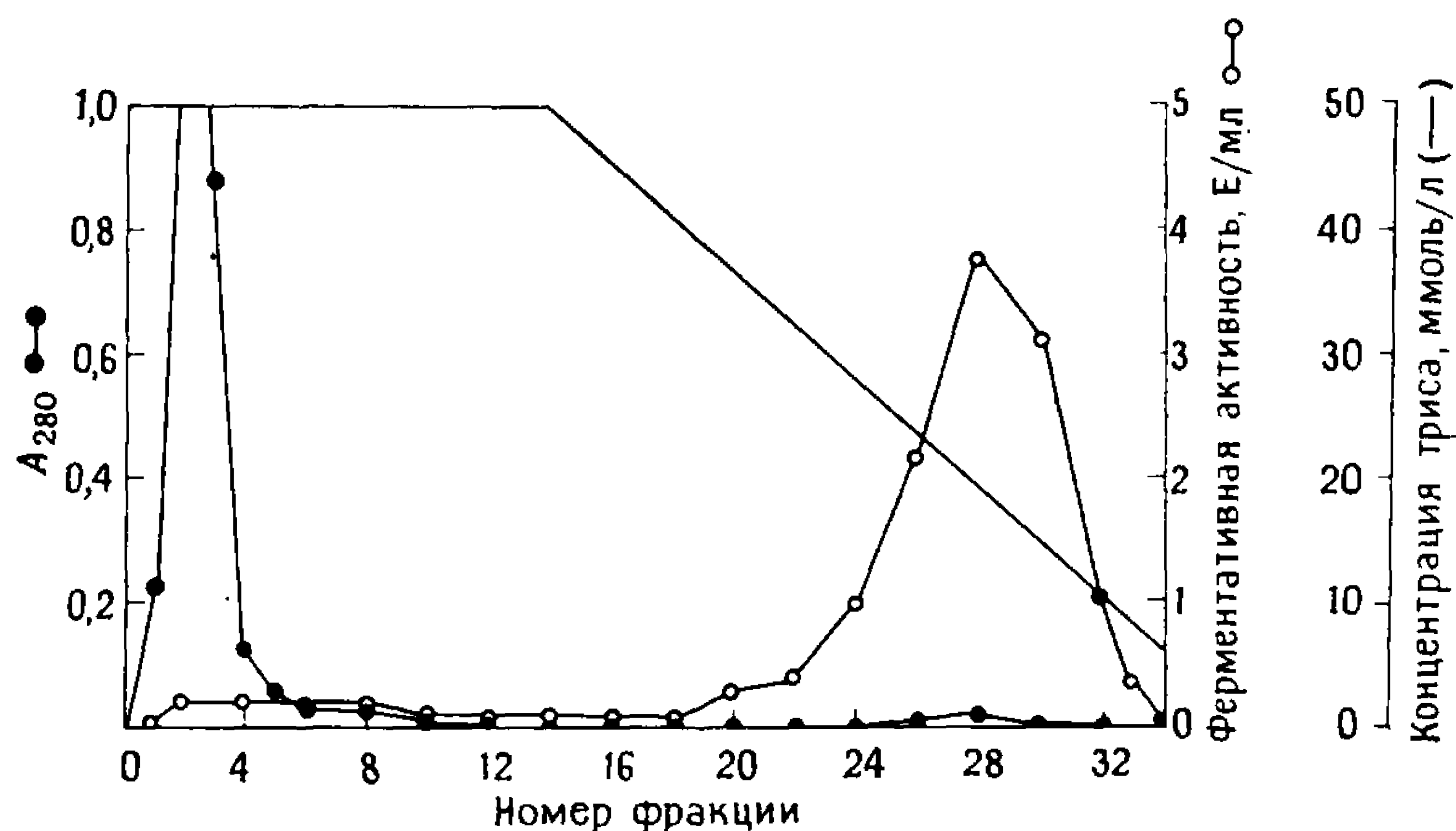


Рис. 10. Хроматография глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *L. mesenteroides* на геле матрекс оранжевый В с использованием обратного градиента трис-HCl [18].

2) На колонку наносят образец частично очищенной глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (40 Е, 7,3 мг, уд. акт. 5,5 Е/мг), которую получают пропусканием неочищенного бактериального цитозоля через колонку с гелем матрекс пурпурный А.

3) Колонку промывают уравновешивающим буфером (12 мл) при скорости потока 4 мл/ч и отбирают фракции по 1 мл до тех пор, пока поглощение элюента при 280 нм не станет ниже 0,05.

4) Через колонку пропускают обратный градиент трис-HCl-буфера (pH 7,8; 30 мл) при изменении концентрации от 50 до 0 ммоль/л. Градиент готовят в обычном смесителе, но меняют порядок расположения резервуаров на обратный так, чтобы 50 мМ буфер располагался первым к входу в колонку.

5) Все фракции контролируют по поглощению при 280 нм и анализируют на ферментативную активность и содержание белка; полученные данные используют для расчета выхода и степени очистки.

Типичные результаты представлены на рис. 10.

8.7. Хаотропные реагенты

В табл. 4 перечислены некоторые реагенты, используемые для десорбции комплексов антиген — антитело, когда один из двух компонентов иммобилизован на твердом носителе. Многие из них относятся к хаотропным реагентам. Необходимые концентрации додецилсульфата натрия, мочевины или солей гуанидиния, иодида или тиоцианата приведены также в табл. 4.

8.8. Электрофоретическая десорбция

Электрофоретическая десорбция была разработана для мягкого удаления заряженного вещества с аффинных матриц, в особенности с иммуноадсорбентов, без использования хаотропных реагентов [37, 38]. Метод дает прекрасные выходы и применим во всех случаях, когда имеет место обратимое равновесие при взаимодействии компонентов аффинной системы. Он ис-

Таблица 4. Некоторые элюенты, используемые для десорбции с иммуноадсорбентов [20]. (Воспроизведено с разрешения.)

Гаптен	Элюент	Литература
1) *Кислоты (pH 3)*		
Инсулин	0,01÷1 M HCl	
Инсулин	1 M уксусная кислота, pH 2,0	21
Анти-ДНФ аминокислоты	20%-ная (об./об.) муравьиная кислота	22
	Глицин-HCl, pH 2,8	23
Аллергены амброзии высокой	Глицин-H_2SO_4, pH 2,7	24
	1 M пропионовая кислота	25
2) *Соли*		
IgG	0,2÷2 M тиоцианат натрия	26
	2,5 M NaI, pH 7,5	27
	2,8 M $MgCl_2$	28
Вирус *Semliki Forest*	Карбонат/бикарбонат, pH 11	29
3) *Вещества, денатурирующие белки*		
ДСН	0,01÷0,1 (масс./об.) ДСН	
Соматомаммотропин хориона человека	6 M гуанидин-HCl pH 3,1	30
β-Липопротеин	4 M мочевина	31
Галактозидаза	8 M мочевина	32
4) *Гаптены*		
n-Аминофениллактозид	0,5 M лактоза	33
ДНФ-лизин	ДНФ, ДНФ-лизин	34
5) *Другие элюенты*		
Человеческий комплемент C1	0,2 M 1,4-диаминобутан	35
IgG	Дистиллированная вода	36

ключает необходимость элюирования конкурентным лигандом, а также концентрирование больших объемов элюата. Метод электрофоретической десорбции опробован на многих системах: антистероидные антитела — иммобилизованный стероид [39, 40], иммуноглобулин — иммобилизованный белок А [41], второе антитело против Con A — иммобилизованный Con A [41], ферритин — иммобилизованные антитела против ферритина

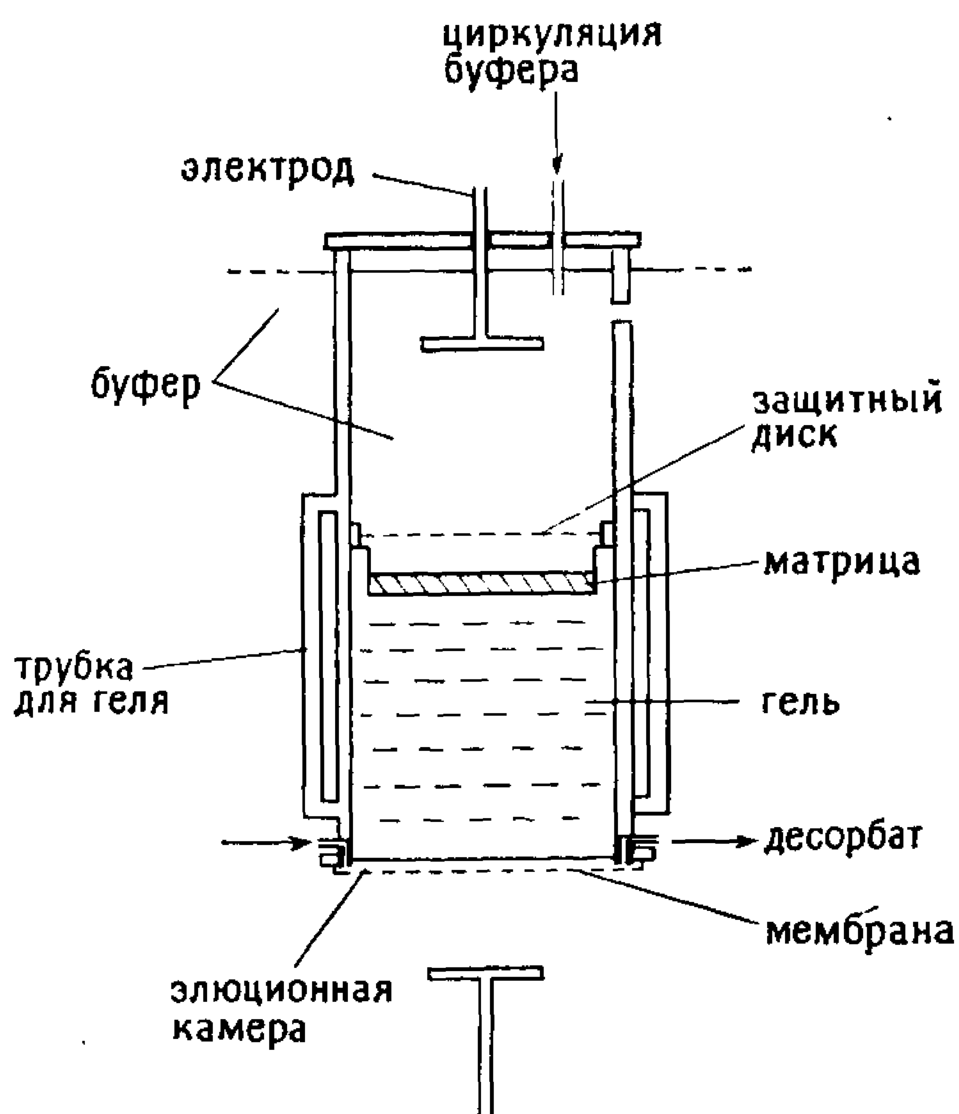


Рис. 11. Десорбционная ячейка для удаления связанных макромолекул с аффинных гелей с помощью электрических полей [44]. (Воспроизведено с разрешения.)

[42], глобулин, связывающий половой гормон — иммобилизованный андростандиол [43] и человеческий сывороточный альбумин — иммобилизованный цибакрон голубой 3G-A [44].

Электрофоретическую десорбцию белка с матрицы можно осуществить с использованием модифицированной ячейки Macro для электрофореза в полиакриламидном геле (Birchover Instruments Ltd., Великобритания), устройство которого изображено на рис. 11. Полиакриламидный гель (7,5%-ный) должен иметь углубление по центру на верхней поверхности для предотвращения возможной потери матрицы. Диск пористого полипропилена, находящийся на выступе геля, предотвращает взмучивание матрицы, вызываемое высокими скоростями циркуляции буфера (500 мл/мин). Циркуляция буфера в свою очередь предотвращает любые возможные локальные изменения pH. Перед нанесением матрицы гели предварительно подвергают

электрофорезу в течение 30 мин. Направление тока должно быть таковым, чтобы при используемом pH белки мигрировали через гель к элюционной камере.

Прибор оснащен 12-канальной, записанной на перфокарте программой, по которой происходит автоматический контроль подачи электроэнергии и периодический отбор жидкости из десорбционной камеры. Температура буфера в процессе электрофореза поддерживается при помощи охлаждающего змеевика, погруженного в резервуар для буфера и соединенного с термостатом и насосом. В отбираемых из десорбционной камеры пробах (десорбат) определяется содержание белка. При оптимизации указанного выше процесса могут быть получены хорошие выходы.

В работе [45] описан другой метод десорбции связавшегося материала с матрицы с использованием изоэлектрического фокусирования. Аффинный гель помещается в предварительно фокусированный градиент pH, который получают электрофорезом плоского слоя амфолитсодержащего геля. Система работает при низкой силе тока и высоком напряжении. Хотя ни этот метод, ни электрофоретическая десорбция по существу не были оптимизированы, оба метода открывают возможность проводить десорбцию в мягких условиях даже в случае систем с высоким сродством, таких, как биотин — авидин и антиген — антитело.

8.8.1. Выделение IgG, связанного с иммобилизованными антигенами.

1) Готовят плоский слой геля для изоэлектрического фокусирования из шариков сефадекса G-200 Superfine, предварительно набухших в соответствующем буфере и содержащих 1—5%-ный (об./об.) раствор амфолита (концентрация растворов амфолита, выпускаемых различными фирмами, может варьировать; надо следовать прилагаемым инструкциям).

2) В первую очередь ставят опыт, используя широкий набор амфолитов (pH 3—10).

3) Через слой пропускают электрический ток и проводят фокусирование при охлаждении (при 2000 В/ч).

4) После установления градиента pH прекращают подачу электрического тока, наносят аффинный гель в выемку с pH, отличающимся на 1—2 единицы от изоэлектрической точки белка (в случае IgG выбирают значения pH 5,5÷6,0 или 10).

5) Присоединяют источник тока и проводят электрофокусирование при напряжении, которое допускает система охлаждения.

6) Через 1 ч часть плоского слоя геля из сефадекса G-200 в области изоэлектрической точки IgG удаляют и анализируют его на антитела.

Фирма Pharmacia поставляет оборудование для этого эксперимента; перед работой следует ознакомиться с прилагаемыми инструкциями, а также с работой [45].

9. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ ПЕРЕГОРОДОК В КРУПНОМАСШТАБНЫХ АФФИННЫХ КОЛОНКАХ

9.1. Введение

Аффинная хроматография нашла широкое применение для очистки биологических продуктов в небольшом масштабе. Для промышленного применения обычно необходимы хроматографические колонки большого диаметра. Однако в крупномасштабных колонках уплотнение слоя адсорбента ограничивает максимальную поверхностную скорость потока жидкости и может быть причиной непостоянства этой скорости. В работе [46] предложено размещать в колонке с внутренним диаметром 10,0 см параллельные стенкам колонки (коаксиальные) цилиндрические перегородки; при этом изучено влияние наличия таких перегородок на максимальную поверхностную скорость и профили проскока и элюирования. В следующем разделе кратко описаны соответствующие эксперименты.

9.1.1. Сравнение эффективности хроматографических колонок с перегородками и без них.

1) Используя методы, описанные в гл. 1, готовят адсорбент путем иммобилизации ингибитора трипсина из соевых бобов на CNBr-активированной сефарозе 4B.

2) Для регулирования адсорбционной емкости слоя сорбента полученный адсорбент смешивают с сефарозой 4B в соотношении 7 : 93 (об./об.).

3) Работу проводят в двух полиакриловых колонках с внутренними диаметрами 1,44 и 10,0 см.

4) Для получения равномерного распределения потока жидкости сверху и снизу каждой колонки помещают пористые стеклянные фильтры.

5) Собирают один из двух типов коаксиальных перегородок — один, состоящий из трех коаксиальных цилиндров с внутренним диаметром 2,5, 5,0 и 7,5 см, и другой — из цилиндра с внутренним диаметром 5,0 см (все детали сделаны из нержавеющей стали толщиной 0,4 мм) — и вставляют в колонку с внутренним диаметром 10,0 см.

6) Упаковывают каждую колонку адсорбентом так, чтобы на единицу площади поперечного сечения колонки приходилось одинаковое количество адсорбента; изучают влияние диаметра колонки и наличия в нем перегородок. Для этого снимают следующие параметры:

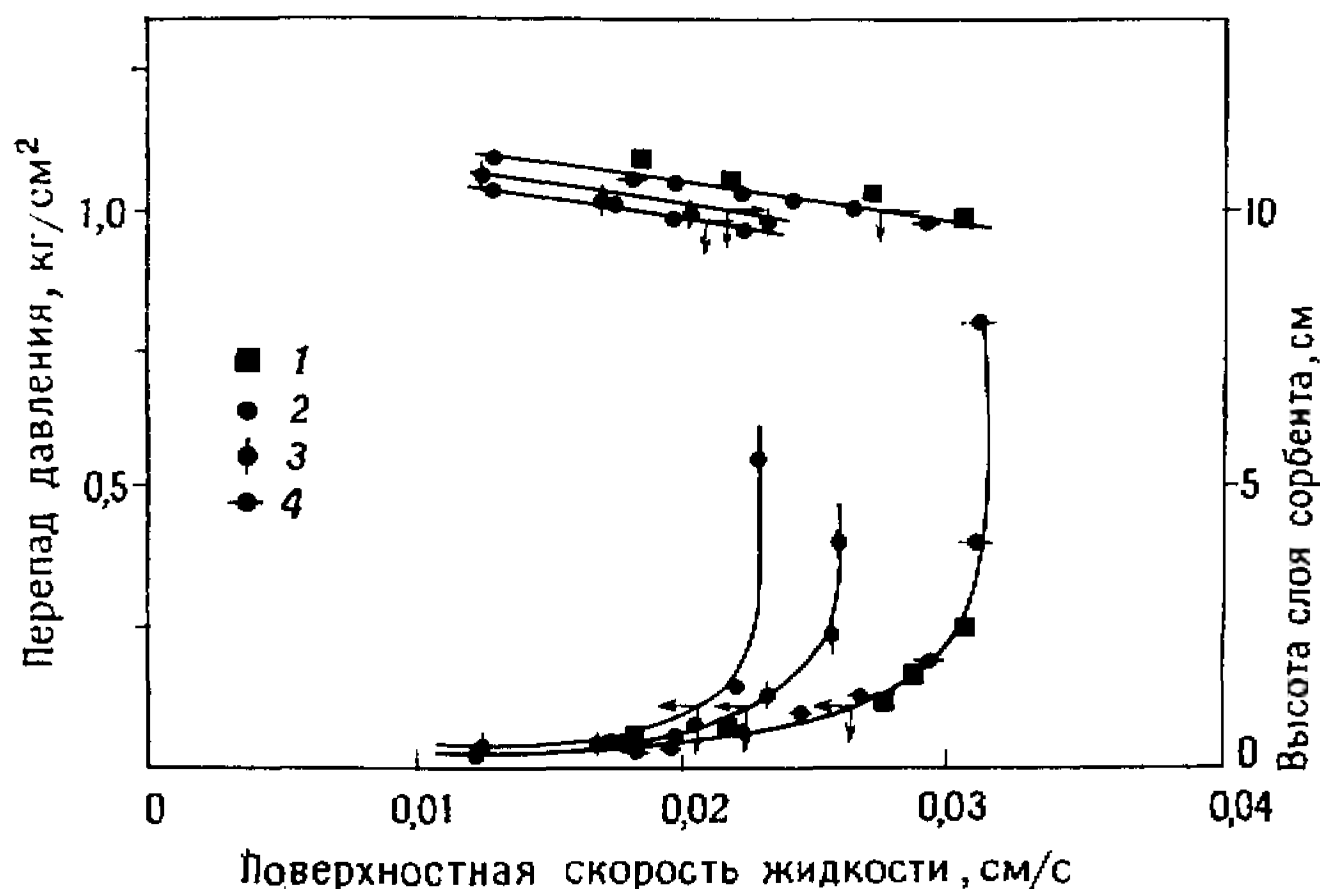


Рис. 12. Изменение перепада давления и высоты слоя сорбента при изменении поверхностной скорости жидкости для колонок с двумя разными диаметрами и различными перегородками. Особенности и диаметр колонки: *1* — 1,44-см без перегородок; *2* — 10,0-см без перегородок; *3* — 10,0-см с 5,0-см перегородкой; *4* — 10,0-см с 2,5-, 5,0-, 7,5-см перегородками [46]. (Воспроизведено с разрешения.)

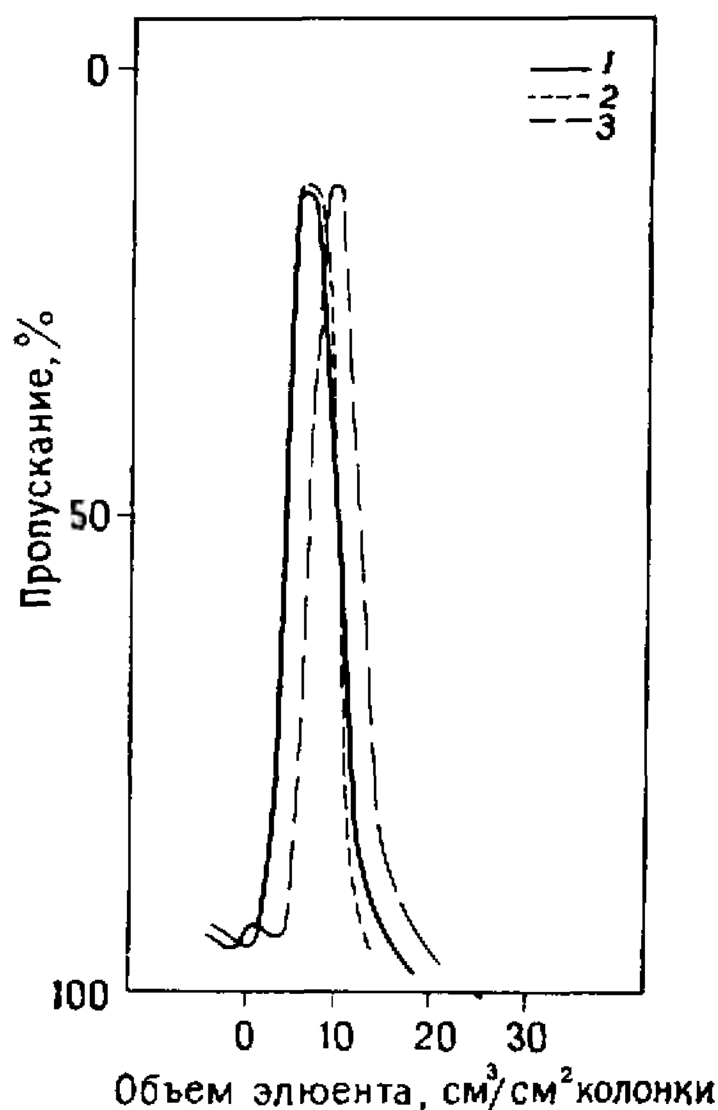


Рис. 13. Кривые элюирования на колонках с перегородками и без них (высота слоя сорбента ~10 см, скорость жидкости 0,02 см/с). Использованы колонки следующих диаметров: *1* — 1,44-см без перегородок; *2* — 10-см с 2,5-, 5,0- и 7,5-см перегородками; *3* — 10-см без перегородок [47]. (Воспроизведено с разрешения.)

а) перепад давления в слое адсорбента;
б) профили проскока;
в) кривые элюирования.

7) Колонку уравновешивают буферным раствором (0,05 М трис-HCl, содержащий 0,02 М $CaCl_2$, pH 8,2).

8) Раствор трипсина в том же буфере вводят в колонку с помощью перистальтического насоса.

9) Колонку промывают тем же буфером и элюируют трипсин раствором, содержащим 0,005 моль/л HCl и 0,5 моль/л NaCl.

10) Измеряют поглощение элюата при 280 нм.

11) Измеряют манометром перепад давления потока через слой сорбента. Все измерения проводят при 20 °C.

12) Определяют активность и чистоту трипсина с использованием хлорогидрата *п*-нитроанилида бензоиларгинина и хлорогидрата *п*-нитрофенил-*п*′-гуанидинобензоата.

9.2. Результаты и обсуждение

9.2.1. Максимальная поверхностная скорость. На рис. 12 представлены результаты эксперимента на колонках с внутренним диаметром 1,44 и 10,0 см, снабженных цилиндрическими перегородками высотой 9 см или без них. При увеличении скорости жидкости перепад давления увеличивался, а высота слоя сорбента уменьшалась. По достижении определенной скорости жидкости перепад давления быстро увеличивается ввиду уплотнения шариков сефарозы. Максимальная скорость для колонки диаметром 1,44 см была выше, чем для колонки диаметром 10,0 см без перегородок, и почти равной скорости для 10,0 см колонки с набором коаксиальных перегородок (диаметр 2,5, 5,0 и 7,5 см).

Введение перегородок оказывает заметное влияние на кривые элюирования (рис. 13). Кривые элюирования для 10,0-см колонки с перегородками (диаметр 2,5, 5,0 и 7,5 см) совпадали с кривыми элюирования для 1,44-см колонки. В то же время элюирование трипсина с 10,0-см колонки без перегородок было более продолжительным.

Увеличение диаметра немодифицированных колонок приводит к уменьшению максимальной скорости жидкости и уширению пиков проскока и элюирования ввиду уплотнения шариков сефарозы. Однако эти недостатки исключаются при введении в колонку коаксиальных цилиндрических перегородок.

10. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИНИ-КОЛОНОК ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Р. Уолтерс (R. R. Walters)

Благодаря высокой селективности метода аффинной хроматографии прекрасное разделение могут обеспечить даже очень короткие колонки. Для отдельных простых экспериментов вполне пригодны обычные химические пипетки и другие самодельные колонки, однако для быстрой и чувствительной аналитиче-

ской работы необходимы специальные колонки для высокоэффективной аффинной хроматографии (ВАФХ), которые обеспечивают сведение к минимуму уширения пиков и возможность работы под умеренным давлением.

10.1. Изготовление колонок

Арматуру колонки (фитинги) изготавливают для стальных колоночных трубок с наружным диаметром 0,25″ и для соединительных трубок с наружным диаметром 0,0625″. В лаборатории автора были изготовлены колонки длиной от 2 мм до 10 см. Концевые фитинги могут быть сделаны из стали или дельрина; последний легче подвергается обработке и, кроме того, может выдерживать давление до 5000 ат.

Детали конструкции колонки схематически изображены на рис. 14. Впускные и выпускные концевые фитинги *1* изготавливают из трубок (гексагональной формы; диаметр 0,75″) из нержавеющей стали 304 или дельрина. Соединения для впускной и выпускной трубок делают под фитинги 0,0625″ с резьбой 10/32 (*2*), например фитинги фирм Swagelok или Parker. Отверстие диаметром 0,0625″ соединяется с отверстием *4* диаметром 0,0135″ с конусообразным отверстием диаметром 0,08″ и глубиной 0,015″ (*4*). Выемка *9* глубиной 0,160″ служит для вынимания фритт *5* и О-колец *8*.

Концевые фитинги соединены друг с другом гексагональным латунным соединением (диаметр 0,75″) длиной на ~0,5″ больше, чем длина заготовки для колонки. Латунный соединитель и концевые фитинги имеют диаметр 0,625″ с резьбой 32. Заготовка для колонки *7* из нержавеющей стали (316 low RMS) с наружным диаметром 0,25″ (Alltech, США) вырезается и обрабатывается на токарном станке.

Затворы образуются двумя фриттами с наружным диаметром 0,25″ (*5*) (Alltech), заполненными фтороуглеродом, причем их диаметр соответствует внутреннему диаметру колонки. В желобок в выпускном концевом фитинге вставляется каучуковое О-кольцо *8* размером 0,25″ (внутренний диаметр)×0,0625″. О-кольцо удерживает колонку в выпускном концевом фитинге, но не является частью затвора высокого давления.

Латунный соединитель *6* может быть использован в качестве водяной рубашки после присоединения медных трубок (диаметр 0,5″) к любому концу соединителя. Резьба соединителя также должна быть снабжена уплотняющим материалом.

10.2. Упаковка колонки

Частицы диаметром 10 мкм обычно упаковываются в колонку суспензионными методами под высоким давлением [47, 48]. Многие биохимические лаборатории не имеют необходимого

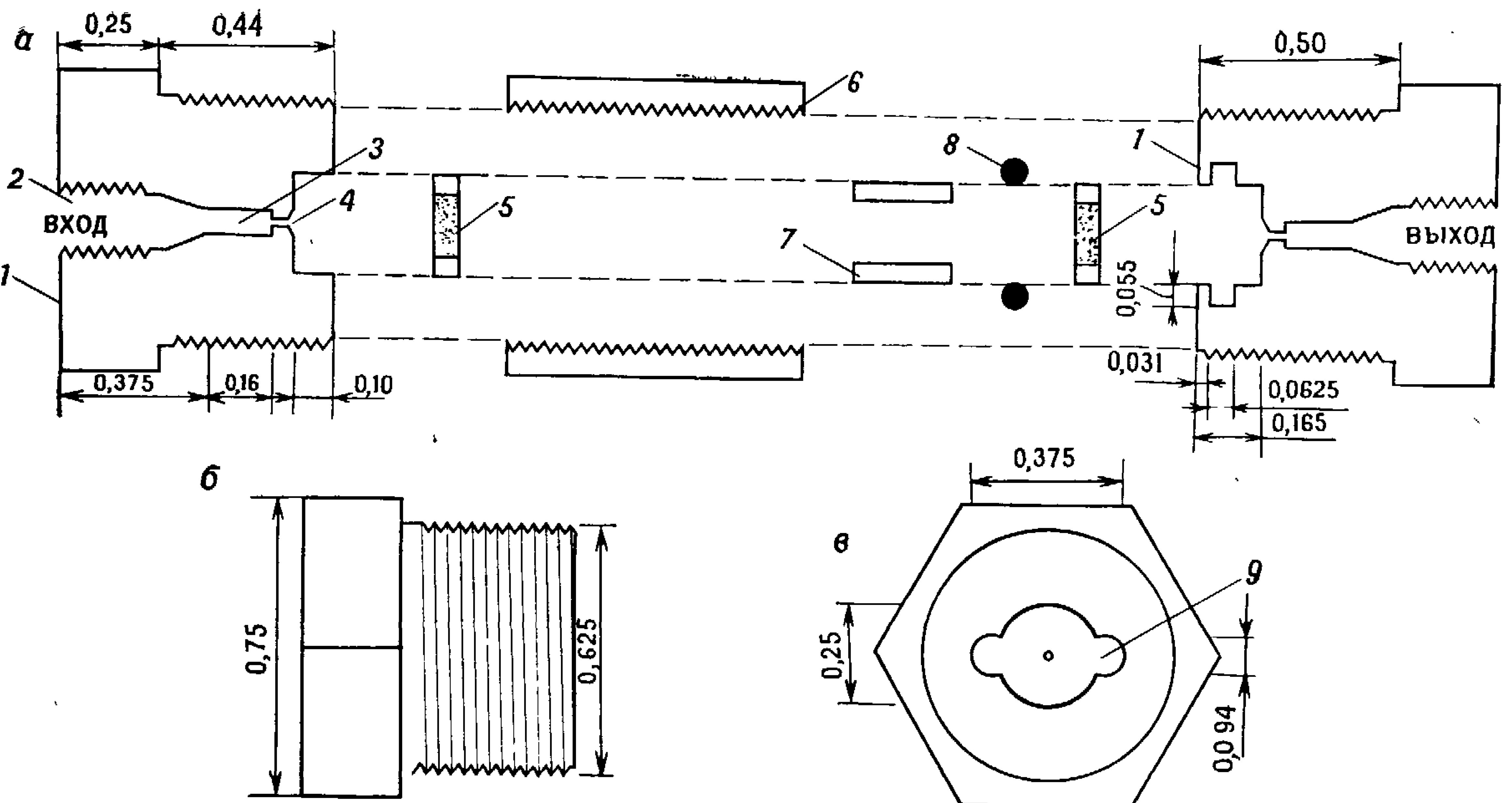


Рис. 14. Детали конструкции колонки: *а* — сечение по оси концевых фитингов, колонки и фритт в разобранном виде; *б* — вид сбоку впускного концевого фитинга; *в* — поперечное сечение впускного и выпускного концевых фитингов. Все размеры даны в дюймах. Впускной и выпускной концевые фитинги имеют одинаковые размеры; различия указаны. Другие подробности приведены в тексте.

для этих целей оборудования, поэтому ниже приводится описание еще двух других методов изготовления коротких колонок, эффективность которых сравнима с таковой для колонок, приготовленных суспензионным методом.

В любом методе упаковки колонок важно удалить из упаковываемого материала слишком мелкие и слишком большие частицы. Для удаления мелких частиц материал суспендируют в буфере, кратковременно обрабатывают ультразвуком и после оседания основной массы упаковываемого материала сливают жидкость вместе со взвесью мелких частиц. Большие частицы, например агломераты сорбента и пыли, можно удалить либо путем отделения материала, который оседает первым, либо путем пропускания суспензии упаковываемого материала через мелкое сито (40 мкм).

Требуемое количество упаковываемого материала можно определить, принимая плотность для сорбентов на основе силикагеля, равной 0,4—0,6 г/мл.

При использовании суспензионных методов упаковки с применением водного буфера получают намного более эффективные колонки, чем в случае работы с суспензиями в чистой воде.

10.2.1. Сухая упаковка.

1) Фритту *5* и О-кольцо *8* устанавливают в выпускном концевом фитинге *1*.

2) Трубку колонки *7* вставляют в концевой фитинг.

3) В колонку добавляют сухой упаковываемый материал небольшими порциями, легко постукивая по колонке несколько раз в промежутках между порциями.

4) После заполнения колонки верхний слой адсорбента выравнивают с помощью шпателя.

5) В конце сборки колонки присоединяют впускной концевой фитинг *1*, фритту *5* и соединитель *6*.

10.2.2. Вакуумная суспензионная упаковка. Этот метод более удобен, чем сухая упаковка, так как отпадает необходимость высушивания упаковываемого материала после иммобилизации аффинного лиганда. Упаковываемый материал в виде концентрированной суспензии постоянно вводится через пипетку в выпускной концевой фитинг (собранный, как описано выше), соединенный с вакуумным насосом. Время упаковки колонки занимает лишь ~1 мин. После выравнивания упакованного материала сборку колонки заканчивают, как описано выше.

10.2.3. Количество вводимого образца. Максимальное количество образца, которое может быть нанесено на колонку без появления части образца в исключающемся объеме (динамическая адсорбционная емкость), зависит от нескольких параметров:

площади поверхности носителя, поверхностной концентрации и активности иммобилизованного лиганда и кинетических и равновесных констант системы. Были определены динамические емкости для 6-мм миниколонок, которые оказались равными 5—500 мкг или приблизительно 20—200 мкг/м^2 площади поверхности [49].

10.2.4. Эффекты, не относящиеся к колонке. С коротких колонок элюируются фракции небольшого объема. Наличие соединительных трубок, трубок теплообменников и проточной кюветы может быть причиной уширения пиков и разбавления соответствующих фракций [49]. Для быстрейших и наиболее чувствительных разделений объемы этих частей и деталей должны быть сведены к минимуму. Наиболее удобно оборудование для ВАФХ, специально предназначенное для ВАФХ-колонок с очень маленьким внутренним диаметром. Если при элюировании используют ступенчатое или быстрое градиентное изменение подвижной фазы, то ВАФХ-смесительная камера должна иметь очень небольшой объем или же ее следует заменить Т-образным соединителем. При использовании надлежащего оборудования разделения методом ВАФХ могут следовать друг за другом с интервалами менее 1 мин.

Литература

1. *Falkbring S. O., Gothe P. O., Nyman P. O., Sundberg L., Porath J.*, FEBS Lett., **24**, 229 (1972).
2. *Jackson R. J., Wolcott R. M., Shiota T.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **51**, 428 (1973).
3. *Tesser G. I., Fisch H. U., Schwyzer R.*, Helv. Chim. Acta, **57**, 1718 (1974).
4. *Inman J. K., Dintzis H. M.*, Biochemistry (Wash.), **8**, 4074 (1969).
5. *Harvey M. J., Lowe C. R., Craven D. B., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 335 (1974).
6. *Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 341 (1974).
7. *Dean P. D. G., Watson D. H.*, in: Affinity Chromatography, Hofmann-Ostenhoff O. et al. (eds.), Pergamon Press, Oxford, 1978, p. 25.
8. *Balny C., Douzou P.*, Biochimie, **61**, 445 (1979).
9. *Douzou P.*, Q. Rev. Biophys., **12**, 521 (1979).
10. *Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 347 (1974).
11. *Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D.* G., Eur. J. Biochem., **41**, 353 (1974).
12. *Angal S., Dean P. D. G.*, Biochem. J., **167**, 301 (1977).
13. *Qadri F., Dean P. D. G.*, Biochem. J., **191**, 53 (1980).
14. *Middle F. A., Dean P. D.* G., unpublished observations.
15. *Jankowski W. J., von Neuenchhausen W., Sulkowski E., Carter W. A.*, Biochemistry (Wash.), **15**, 5182 (1976).
16. *Bollin E. J. R., Vastola K., Oleszek D., Sulkowski E.*, Prep. Biochem., **8**, 259 (1978).
17. *Seelig G. F., Colman R. F.*, J. Biol. Chem., **252**, 3671 (1977).
18. *Hey Y.*, Ph. D. Thesis, Liverpool University (1983).
19. *Robinson J. B., Jr., Strottman J. M., Stellwagen E.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **78**, 2287 (1981).

20. *Lowe C. R., Dean P. D. G.*, Affinity Chromatography, published by Wiley, London, 1974.
21. *Cuatrecasas P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 531 (1969).
22. *Akanuma Y., Kuzuya T., Hayashi M., Ide T., Kuzuya N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 947 (1970).
23. *Givol D., Weinstein Y., Gorecki M., Wilchek M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 947 (1970).
24. *Ternynck T., Avrameas S.*, Biochem. J., **125**, 297 (1971).
25. *Spitzer R. H., Kaplan M. A., Leija J. G.*, Int. Arch. Allergy, **34**, 488 (1968).
26. *Tanigaki N., Kitagawa M., Yagi Y., Pressman D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 747 (1967).
27. *Dandliker W. B., Alonso R., de Saussure U. A., Kierszenbaum F., Levison S. A., Schapiro H. C.*, Biochemistry (Wash.), **6**, 1460 (1967).
28. *Avrameas S., Ternynck T.*, Biochem. J., **102**, 37C (1967).
29. *Avrameas S., Ternynck T.*, Immunochemistry, **6**, 53 (1969).
30. *Wood K. R., Stephen J., Smith H.*, J. Gen. Virol., **2**, 313 (1968).
31. *Mougdal N. R., Porter R. R.*, Biochim. Biophys. Acta, **71**, 185 (1963).
32. *Weintraub B. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **39**, 83 (1970).
33. *Beaumont J. L., Delphanque B.*, Immunochemistry, **6**, 489 (1969).
34. *Melchers F., Messer W.*, Eur. J. Biochem., **17**, 267 (1970).
35. *Wofsky L., Burr B.*, J. Immunol., **103**, 380 (1969).
36. *Bing D. H.*, J. Immunol., **107**, 1243 (1971).
37. *Morgan M. R. A., Brown P. J., Leyland M. J., Dean P. D. G.*, FEBS Lett., **37**, 239 (1978).
38. *Morgan M. R. A., Dean P. D. G.*, in: Theory and Practice in Affinity Techniques, Sundaram P. V., Eckstein F. (eds.), Academic Press, 1978, p. 15.
39. *Grenot C., Cuilleron C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **79**, 274 (1977).
40. *Morgan M. R. A., Kerr E. J., Dean P. D. G.*, J. Steroid Biochem., **9**, 767 (1978).
41. *Morgan M. R. A., Johnson P. M., Dean P. D. G.*, J. Immunol. Methods, **23**, 381 (1978).
42. *Brown P. J., Leyland M. J., Keenan J. P., Dean P. D. G.*, FEBS Lett., **83**, 256 (1977).
43. *Iqbal M. J., Ford P., Johnson M. W.*, FEBS Lett., **87**, 235 (1978).
44. *Morgan M. R. A., Slater N. A., Dean P. D. G.*, Anal. Biochem., **92**, 144 (1978).
45. *Haff L. A., Lasky M., Manrique A.*, J. Biochem. Biophys. Methods, **1**, 275 (1979).
46. *Sada E., Katoh S., Shiozawa M.*, Biotechnol. Bioeng., **24**, 2279 (1982).
47. *Walters R. R.*, Anal. Chem., **55**, 591 (1983).
48. *Snyder L. R., Kirkland J. J.*, Introduction to Modern Liquid Chromatography, published by Wiley, New York, 1979, p. 216.
49. *Walters R. R.*, Anal. Chem., **55**, 1395 (1983).

Глава 5.

ЛИГАНДЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ

1. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

1.1. Связывание ДНК с КМ-целлюлозой

1.1.1. Материалы. Карбоксиметил-целлюлоза (КМ-целлюлоза) типа СМ-23 № 45030 поставляется фирмой SERVA Feinbiochemical GmbH (Heidelberg); ДНК из тимуса теленка высокополимеризованная — фирмой Sigma (США).

1.1.2. Получение адсорбента (стандартная методика).

1) Готовят суспензию КМ-целлюлозы (1 г) в 0,5 М NaOH (50 мл) и перемешивают ее 30 мин.

2) После декантации материал промывают водой до pH 8,0 в элюате.

3) Готовят суспензию производного КМ-целлюлозы в воде (100 мл) и доводят pH до 3,5 путем добавления 0,1 М HCl.

4) Суспензию фильтруют с отсасыванием, промывают материал этанольно-эфирной смесью (1 : 1) (об./об.) (3 раза по 5 мл), затем эфиром (20 мл) и сушат в течение 60 мин при 40 °C.

5) К полученной КМ-целлюлозе добавляют 20 мг ДНК из тимуса теленка, растворенной в воде (10 мл).

6) Полученную суспензию выливают в чашку Петри и медленно выпаривают воду в течение 60 ч при 40 °C; для регулирования процесса высушивания чашку Петри время от времени накрывают крышкой.

7) Полученную ДНК-целлюлозу собирают с поверхности чашки, измельчают, суспендируют в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 50% (об./об.) глицерина (50 мл), и оставляют на 24 ч при комнатной температуре.

8) Продукт промывают водой (10 раз по 10 мл) и хранят при 4 °C в 1,0 М растворе NaCl.

При использовании в качестве исходной КМ-целлюлозы фирмы SERVA полученный адсорбент содержит ~15 мг ДНК на 1 г сухой КМ-целлюлозы, что соответствует ~2,5 мг/мл сорбента.

1.2. Иммобилизация нуклеиновых кислот на бисоксиранактивированных полисахаридах

1.2.1. Активация матриц. Бисоксирановая активация сефарозы 6В осуществляется по методике, предложенной Поратом и Сандбергом [1].

1) Целлюлозу (10 г) активируют путем суспендирования в 1,0 М NaOH (30 мл), содержащем борогидрид натрия (60 мг).

2) Добавляют диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (20 мл) и смесь энергично встряхивают в течение 20 ч при комнатной температуре.

3) После фильтрования отсасыванием целлюлозу тщательно промывают ледяной дистиллированной водой до нейтральной реакции элюата.

4) Лиофилизованный материал хранят в эксикаторе при —20 °С. Активированная по данному методу целлюлозная матрица содержит ~10—15 мкмоль реакционноспособных групп на 1 г.

1.2.2. Иммобилизация полинуклеотида.

1) Требуемое количество полинуклеотида растворяют в 20 мМ KCl (5—10 мл/г сухой матрицы), содержащем 10% (об./об.) 1,4-диоксана, и доводят pH раствора до 12,0 путем добавления триэтиламина.

2) Раствор нуклеотида добавляют к активированной матрице и смесь выливают в чашку Петри; оставляют для медленного испарения в течение ~60 ч при 35 °С в атмосфере с относительной влажностью ~30%.

3) Для инактивации непрореагировавших эпоксигрупп материал вновь суспендируют в небольшом количестве 0,01 М NaOH и оставляют на 5 сут при комнатной температуре. Эту методику нельзя использовать в случае полирибонуклеотидов.

1.2.3. Десорбция непрореагировавшего лиганда. Поскольку нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды с высокой молекулярной массой неспецифически взаимодействуют с полисахаридными матрицами, важно удалить непрореагировавший лиганд путем тщательного промывания материала десорбирующим раствором. Для этого готовят суспензию адсорбента в растворе с низкой ионной силой (предпочтительно в дистиллированной воде), содержащем 20—50% (об./об.) гидрофильного органического растворителя, например глицерина или формамида, и осторожно перемешивают в течение 2 сут. Продукт промывают дистиллированной водой и хранят в любом нейтральном буферном растворе (предпочтительно в цитрате) или в лиофилизованном виде при 0÷5 °С.

1.3. Иммобилизация ДНК на целлюлозе с использованием водорастворимого карбодиимида как конденсирующего агента

1) Перед присоединением целлюлозу промывают путем суспендирования 1%-ным (об./об.) метанольным раствором HCl в течение 3 сут при комнатной температуре; затем целлюлозу интенсивно промывают водой на пористом стеклянном фильтре и сушат на воздухе.

2) Готовят раствор ДНК или другого полинуклеотида в воде и доводят pH раствора до 6,0 путем добавления разбавленных растворов HCl или NaOH.

3) Раствор (2,5—250 мкмоль ДНК/мл) добавляют в $^1/_4$ объема 0,2 М 2-морфолиноэтансульфокислоты (МЭС-буфер, pH 6,0), содержащего водорастворимый карбодиимид (в конечном растворе 100 мг карбодиимида/мл). Среди удобных растворимых в воде конденсирующих агентов можно назвать *п*-толуолсульфонат N-циклогексил-N′-β-(γ-метилморфолиний)этилкарбодиимида или хлорогидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида.

4) Добавляют буфер, содержащий карбодиимид, к чистому сухому порошку целлюлозы и перемешивают до получения тонкой пасты.

5) Переносят пасту в чашку Петри и медленно сушат при комнатной температуре.

6) Через 2, 5, 8 и 14 ч чашку Петри помещают на 1 ч в закрытый резервуар, в котором поддерживается насыщенное давление водяного пара при комнатной температуре, а затем возвращают на воздух (в нормальную атмосферу).

7) Через 24 ч сухой порошок целлюлозы тщательно промывают с перемешиванием в большом объеме 0,05 М калийфосфатного буфера (pH 7,0) и собирают продукт путем фильтрования через пористый стеклянный фильтр.

8) Эту операцию повторяют 3—5 раз, а затем промывают водой.

9) ДНК-целлюлозу отделяют путем фильтрования и сушат на воздухе. По другой методике целлюлозу можно суспендировать в 0,1%-ном (масс./об.) аммиаке между первым и вторым промыванием калийфосфатным буфером, благодаря чему удается удалить небольшие количества карбодиимида, который может присутствовать в качестве заместителя на урациловых, тиминовых или гуаниновых основаниях.

1.4. Получение олиго(dT)-целлюлозы

1) 2 мкмоль тимидин-5′-фосфата (в виде пиридиниевой соли) в безводном пиридине (3 мл) добавляют к 2-кратному избытку дициклогексилкарбодиимида.

2) Добавляют несколько стеклянных шариков и встряхивают образовавшуюся тонкую пасту в течение 5 сут при комнатной температуре.

3) Затем к смеси добавляют промытую целлюлозу (5 г), высушенную при 100 °C в течение 10 ч, безводный пиридин (50 мл) и дополнительно еще 2 ммоля дициклогексилкарбодиимида.

4) Эту смесь встряхивают 5 сут при комнатной температуре, отделяют целлюлозу путем фильтрования и промывают пиридином.

5) Подготовленную таким образом олиго(dT)-целлюлозу суспендируют в 50%-ном (об./об) водном пиридине, перемешивание продолжают в течение 10 ч, отделяют модифицированную целлюлозу путем центрифугирования, а затем промывают теплым этиловым спиртом для полного удаления дициклогексилмочевины, накапливающейся в процессе синтеза.

6) Продукт на фильтре промывают дистиллированной водой, пока поглощение промывных вод при 267 нм не станет близким нулю.

Подобный препарат олиго(dT)-целлюлозы может быть получен в водной среде с использованием водорастворимых карбодиимидов. Степень присоединения тимидин-5′-фосфата почти идентична (~60%) достигнутому в неводных условиях. В сущности водный метод почти ничем не отличается от метода, описанного для присоединения ДНК к целлюлозе путем конденсации с карбодиимидом; однако вместо водных растворов ДНК используется раствор тимидин-5′-фосфата в МЭС-буфере (pH 6,0).

1.5. Получение поли(U)-целлюлозы

Поли (U)-целлюлоза — одна из наиболее легко синтезируемых аффинных матриц, основанных на принципе гибридизации.

1) Промытую целлюлозу (1 г) добавляют к раствору продажной поли(U) (8 мг/мл) в дистиллированной воде.

2) Смесь тщательно перемешивают, продукт лиофилизуют и вновь суспендируют в 95%-ном (об./об.) этиловом спирте (10 мл).

3) Суспензию выливают в чашку Петри и облучают 15 мин с помощью УФ-лампы (30 Вт) на расстоянии 20 см от поверхности. Облучение приводит к поперечной сшивке между поли(U) и целлюлозной матрицей.

4) После облучения поли(U)-целлюлозу промывают дистиллированной водой, суспендируют и хранят в 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), содержащем 0,9 моль/л NaCl.

Хотя только ~5% (0,4 мг) исходного количества поли(U) присоединяется к целлюлозе, полученный адсорбент обладает превосходной емкостью по поли(А). Колонка (0,8×20 см) с этим материалом удерживает не менее 1,5 мг поли(А).

1.6. Получение поли(U), присоединенной к пористым стеклянным фильтрам

1) Раствор поли(U) (1 мг/мл) в дистиллированной воде наносят на пористые стеклянные фильтры диаметром 2,4 см (0,15 мл на каждый фильтр).

2) Фильтры сушат на воздухе при 37 °C, а затем облучают по 2,5 мин с каждой стороны, как описано при получении поли(U)-целлюлозы.

3) Затем фильтры промывают водой и сушат.

В этих условиях к каждому фильтру присоединяется ~0,1 мг поли(U).

1.7. Получение поли(U), присоединенной к CNBr-активированной агарозе

1) Агарозные (4%-ные) шарики (40 г влажного геля) промывают и суспендируют в ледяной воде (60 мл).

2) Добавляют бромоциан (9 г), растворенный в воде (135 мл), и доводят pH до 11,5. Этот pH при необходимости поддерживают путем добавления концентрированного раствора KOH.

3) Через 20 мин агарозу отделяют путем фильтрования и промывают ледяным 0,1 *М* калийфосфатным буфером (pH 8,0; 600 мл).

4) Промытую агарозу суспендируют в 40 мл того же буфера, содержащего поли(U) (20 мг).

5) Смесь составляют при 4 °C в течение 18 ч, промывают 90%-ным (об./об.) формамидом (200 мл) в 10 м*М* фосфате калия, 10 м*М* ЭДТА (pH 7,5; 200 мл) и затем еще 200 мл 25%-ного (об./об.) формамида в 50 м*М* трис-HCl, содержащем 0,7 *М* NaCl и 10 м*М* ЭДТА (pH 7,5).

1.8. Получение ДНК, иммобилизованной на агароза-акриламидной матрице

1) ДНК (60 мг) растворяют в 0,05 *М* трис-HCl (pH 7,8; 100 мл), содержащем акриламид (9,7 г) и N,N′-метиленбисакриламид (0,3 г).

2) Смесь охлаждают до 15 °C и добавляют N,N,N′N′-тетраметилэтилендиамин (0,8 мл).

3) Раствор акриламид-ДНК выливают в равный объем 1%-ного (масс./об.) раствора агарозы при 50 °C, смесь быстро перемешивают и добавляют при перемешивании раствор персульфата аммония (0,15 г) в минимальном объеме воды.

4) Выдерживают смесь 30 мин; гель разрезают на кубики объемом 1 см^3, а затем эти кубики продавливают через сетку из нержавеющей стали для получения мелких частиц.

2. БЕЛКИ

В гл. 3 уже была описана иммобилизация гонадотропина хориона человека (ГХЧ) путем активации реакционноспособным азокрасителем. Этим же методом Грибнау и сотр. иммобилизовали также другие белки, например анти-ГХЧ кролика и анти-(кроличий IgG) барана.

2.1. Иммобилизация альбумина и IgG на агарозе

2.1.1. Иммобилизация на агарозе через бромоциановую активацию.

1) Агарозный гель (10 г потрескавшейся на фильтре, но еще влажной агарозы) суспендируют в 0,1 М $NaHCO_3$ (10 мл) и доводят pH до 11,0 путем добавления 4,0 М NaOH.

2) Температуру доводят до 18±1 °С путем добавления в смесь измельченного льда.

3) Постепенно в течение 2—3 мин прибавляют при постоянном осторожном перемешивании на магнитной мешалке твердый CNBr (1,0 г).

4) Поддерживают pH 11,0±0,1 путем добавления 4,0 М NaOH; температура 18±1 °С. Продолжительность активации 12 мин.

5) Активированный гель промывают поочередно ледяными 0,1 М $NaHCO_3$ и 5%-ным (об./об.) ацетоном; для заключительного промывания надо использовать 0,1 М $NaHCO_3$.

2.1.2. Реакция присоединения.

1) К гелю добавляют раствор присоединяемого белка в 10—20 мл буфера для присоединения, например в буфере состава 50 мМ фосфат натрия (pH 7,4), содержащий 0,1 М NaCl, и перемешивают суспензию на роторном смесителе Coulter в течение 24 ч при 4 °С.

2) Гель тщательно промывают дистиллированной водой, а затем поочередно 0,1 М ацетатом натрия (pH 4,0), содержащим 0,5 М NaCl, и буфером для присоединения, используемом для растворения белка, с целью удаления электростатически связанного белка.

3) Непрореагировавшие активные группы блокируются путем добавления 0,5 М этаноламина/HCl (pH 9,0).

2.2. Иммобилизация белков на эупергите С (оксиран-акриловые шарики). Общая методика

1) Сухие шарики эупергита С (4 г) помещают в 15 мл раствора белка (70 мг) в буфере для присоединения и оставляют в течение 2 сут при комнатной температуре.

2) Удаляют неприсоединившийся белок промыванием на пористом фильтре дистиллированной водой, 1,0 *М* NaCl и вновь водой.

3) Оставшиеся активные группы блокируют, для чего готовят суспензию шариков в 5%-ном (масс./об.) растворе меркаптоэтанола с pH 8,0 (доводится 0,5 *М* NaOH) и перемешивают в течение 1 сут при комнатной температуре.

4) Интенсивно промывают шарики дистиллированной водой и затем буфером для присоединения (pH 7,4).

Обработка меркаптоэтанолом приводит к электронейтральному и гидрофильному сорбенту. Избыток оксирановых групп может быть блокирован другими реагентами, такими, как 2-аминоэтанол, а также глицин и тиоуксусная кислота, каждый из которых вводит в матрицу ионизуемые группы.

2.2.1. Иммобилизация трипсина на эупергите С.

1) Готовят раствор трипсина (150 мг) в 1,0 *М* калийфосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 0,05% этилового эфира *п*-гидроксибензойной кислоты (4 мл).

2) Этот раствор добавляют к 1 г эупергита С (масс./об).

3) Смесь хорошо перемешивают и оставляют без перемешивания при комнатной температуре (23 °С) в течение 72 ч.

4) Продукт тщательно промывают, как описано выше в разд. 2.2.

5) Хранят при 5 °С в виде суспензии в фосфатном буфере (0,01 *М*, pH 7,5), содержащем 0,05% (масс./об.) этилового эфира *п*-гидроксибензойной кислоты.

2.2.2. Определение активности трипсина, иммобилизованного на эупергите С. Активность трипсина, иммобилизованного на эупергите С, может быть определена с использованием pH-метра, который должен быть оборудован автоматической бюреткой и контролируемой pH-электродом ячейкой для титрования, что позволяет осуществлять непрерывное титрование до установленной конечной точки (т. е. требуемого pH). Одновременно регистрируется количество NaOH пошедшего на титрование; результаты представляются графически в виде зависимости от времени.

Субстрат. Перемешивают казеин (20 г) (E. Merck, ФРГ) с водой (350 мл) и 0,5 *М* NaOH (32 мл) при 60 °С до растворения казеина, после чего раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до 8,0 путем добавления 0,1 *М* HCl. Добавляют воду до конечного объема 500 мл (легкое помутнение может быть вызвано агрегацией казеина).

Методика. Субстрат (20 мл) и трипсин — эуперит С (2 г) перемешивают при 37 °С (pH 8,0) в ячейке pH-метра с автоматическим поддержанием pH и записью показаний для определения

степени гидролиза. Через 10 мин инкубации отделяют шарики на пористом стеклянном фильтре (пористость 2) и инкубируют еще дважды по 10 мин, как описано выше. Повторяют процесс инкубации и фильтрования еще два раза.

Активность рассчитывают как среднее значение активностей после второго и третьего циклов инкубации. 1 Е=1 мкмоль субстрата, гидролизуемого за 1 мин.

Казеинолитическая активность трипсина, иммобилизованного на эупергите С по описанной выше методике, составляет 10 Е/г влажных шариков.

2.2.3. Иммобилизация пепсина на эупергите С.

1) Пепсин (150 мг) растворяют в 1,0 М калийфосфатном буфере (pH 5,5; 4 мл; получен смешиванием 91 мл 1,0 М KH_2PO_4 и 9 мл 1,0 М K_2HPO_4).

2) Добавляют к 1 г эупергита С.

3) Некоторое время перемешивают, а затем оставляют без перемешивания на 72 ч при комнатной температуре.

4) Промывают, как описано выше в разд. 2.2.

5) Хранят в 0,1 М калийфосфатном буфере (pH 5,0), содержащем этиловый эфир *п*-гидроксибензойной кислоты (0,05% масс./об.).

Активность, определенная с использованием гемоглобина в качестве субстрата, составляет 2500—3000 Е/г влажного сорбента.

2.2.4. Иммобилизация липазы (из поджелудочной железы) на эупергите С.

1) Липазу (200 мг) растворяют в 1,0 М калийфосфатном буфере (pH 7,5; 4 мл).

2) Полученный раствор добавляют к эупергиту С (1 г), суспензию тщательно перемешивают и оставляют без перемешивания при комнатной температуре.

3) Промывают, как описано выше.

Согласно опубликованным данным, средняя активность иммобилизованной по этой методике липазы составляла 18 Е/г влажных шариков.

2.2.5. Иммобилизация рибонуклеазы на эупергите С.

1) Рибонуклеазу (50 мг) растворяют в 1,0 М калийфосфатном буфере (pH 7,5; 2 мл), содержащем этиловый эфир *п*-гидроксибензойной кислоты (0,05% масс./об.).

2) Этот раствор добавляют к эупергиту С (250 мг), хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре (23 °С) на 72 ч.

3) Промывают, как описано выше.

4) Хранят при 5 °С в 0,1 М калийфосфатном буфере (pH 7,5).

Определяют активность РНКаза-эупергита с помощью pH-

метра с автоматической бюреткой и записью показаний, как описано выше для трипин-эупергита С.

Субстрат. РНК (10 г) из дрожжей (Boehringer Mannheim GmbH, ФРГ) растворяют в 0,2 М NaOH (125 мл). С помощью 0,1 М NaOH (или 0,1 М HCl) доводят pH до 7,5 и разбавляют дистиллированной водой до конечного объема 250 мл.

Субстрат (20 мл) инкубируют с РНКаза-эупергитом С (500 мг влажных шариков) при 37 °С (pH 7,5). Титруют 0,5 М NaOH. Используя те же шарики, осуществляют три последовательные инкубации. Ферментативную активность определяют по тангенсу угла наклона начального участка зависимости скорости реакции от времени (т. е. количество раствора NaOH, пошедшего на титрование в первые 5 мин); рассматривают среднее значение активности из значений, найденных для второго и третьего циклов инкубации. 1 Е=1 мкмоль гидролизованной фосфоэфирной связи в минуту.

Активность РНКаза-эупергита С, полученного вышеуказанным методом, составляет ~60 Е/г влажного сорбента.

2.2.6. Иммобилизация гемоглобина на эупергите С.

1) Человеческий гемоглобин (Sigma, тип IV) (125 мг) растворяют в 1,0 М калийфосфатном буфере (pH 7,5, содержит 0,1% азида натрия) (5 мл). Добавляют этот раствор к эупергиту С (1 г); хорошо перемешивают и оставляют без перемешивания на 72 ч при комнатной температуре.

2) Промывают три раза 1,0 М NaCl и пять раз дистиллированной водой.

3) Смешивают промытые шарики с меркаптоэтанолом [5%-ный (об./об.) раствор, 2,5 мл], доводят pH до 8,0 и оставляют на ночь при комнатной температуре.

4) Промывают дистиллированной водой (10 раз).

5) Шарики упаковывают в небольшую колонку и промывают 0,1 М калийфосфатным буфером (pH 7,5; 50 мл), 0,5 М калийфосфатным буфером (pH 7,5; 50 мл), 3,5 М тиоцианатом натрия (50 мл) и в заключение буфером состава 0,01 М фосфат натрия, (pH 7,2)+0,15 М NaCl; промывные воды контролируют по поглощению при 418 нм. Промывание заканчивают, когда поглощение составляет <0,01.

2.2.7. Аффинная очистка антител к человеческому гемоглобину из сыворотки крови козы с использованием иммобилизованного на эупергите С гемоглобина.

1) Антисыворотку (антитела козы против человеческого гемоглобина) (1 мл) осторожно наносят на колонку с шариками, полученными, как описано выше, в разд. 2.2.6.

2) Добавляют 1 мл 0,01 М натрийфосфатного буфера (pH 7,2), содержащего 0,15 М NaCl.

3) Встряхивают колонку (или перемешивают путем вращения закрытой колонки) в течение 1 ч.

4) Колонку промывают натрийфосфатным-NaCl-буфером (pH 7,2) до поглощения промывных вод при 280 нм <0,01.

5) Пропускают через колонку 3,5 М тиоцианат натрия (30 мл) при скорости потока 15—30 мл/ч.

6) Собирают фракции, содержащие белок, и проводят диализ против натрийфосфатного-NaCl буфера до отрицательной реакции на тиоцианат (для контроля на тиоцианат: 1 мл элюата+0,1 мл 1,0 М HCl+0,05 мл 4,5% $FeCl_3$ в 0,02 М HCl).

7) Для концентрирования раствора после диализа используют ультрафильтрацию или вакуумный диализ. Для концентрирования раствора объемом 30—50 мл до 1 мл с помощью вакуумного диализа требуется 24 ч; тем не менее этот метод дает высокие выходы очищенных антител.

8) Продукт хранят при —20 °C.

9) Для характеристики чистоты и количественного определения антител используют один из следующих методов:

а) иммунодиффузионный метод Оухтерлони;

б) иммуноэлектрофорез по Грабарю — Вильямсу;

в) электрофорез в плоском слое (изоэлектрическое фокусирование).

2.3. α_2-Макроглобулин, связанный с носителем

α_2-Макроглобулин обладает высоким сродством к ионам Zn^{2+}, поэтому белок может быть связан с агарозным носителем через хелатный комплекс с цинком [3]. С использованием α_2-макроглобулина можно удалить из растворов почти все известные эндопротеиназы, включая карбокси-, тиоловые, сериновые и металлопротеиназы. Такой адсорбент удобен для удаления в одну стадию большинства примесных протеиназ, например из неочищенных экстрактов, растворов ферментов или среды клеточных культур.

2.4. Иммобилизация уреазы на найлоне

1) Внутреннюю поверхность трубки длиной 2 м из найлона типа 6 (внутренний диаметр 0,1 см) частично гидролизуют, пропуская 3,0 М HCl в течение 60 мин при 30 °C со скоростью потока 2 мл/мин.

2) Для прекращения гидролиза трубку промывают водой, а затем обрабатывают 2,5%-ным (об./об.) раствором глутарового альдегида в бикарбонатном буфере (pH 9,4) при 0 °C со скоростью потока 2 мл/мин.

3) Трубку промывают фосфатным буфером (pH 8,0), содержащим 1 мМ ЭДТА, при 0 °C, а затем заливают на 30 мин при 0 °C 7,5%-ным (масс./об.) раствором уреазы в фосфатном бу-

фере, содержащем ЭДТА (1 ммоль/л) и меркаптоэтанол (10 ммоль/л).

4) Для удаления нековалентно связанного фермента внутреннюю поверхность трубки обрабатывают поочередно 0,1 М $NaHCO_3$, 1,0 М NaCl и водой.

5) Хранят трубку при 4 °С в воде до использования.

По этой методике присоединяется ~62,5 мкг белка на 1 м длины трубки.

2.5. Иммобилизация пепсина

2.5.1. Иммобилизация на гелях сферон. После активации бромцианом к гидроксиалкилметакрилатным гелям типа сферон присоединяют по методике Куатреказаса [5] 1,6-диаминогексан или ε-аминокапроновую кислоту. Полученные таким образом производные обозначены как NH_2-сферон и COOH-сферон.

1) 4,8 мл NH_2-сферона или COOH-сферона суспендируют в 15 мл 0,1 М ацетата натрия (pH 4,0), содержащего 300 мг пепсина.

2) После перемешивания к каждой порции адсорбента добавляют в течение 5 мин 100 мг хлорогидрата N-этил-N′-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и продолжают перемешивание на магнитной мешалке при 4 °С.

3) Через 22 ч жидкую фазу с обоих образцов сливают; промывают несколько раз 0,1 М ацетатом натрия (pH 4,1), содержащим 1,0 М хлорид натрия, переносят сорбенты в колонки и последовательно промывают этим же буфером и 3,0 М мочевиной (pH 3,0).

4) В заключение промывают гели 0,01 М ацетатом натрия (pH 4,1) и 0,1 М уксусной кислотой и хранят во влажном состоянии после фильтрования при 4 °С.

Количество присоединенного фермента может быть определено по количеству кислых и нейтральных аминокислот в гидролизате после кислотного гидролиза высушенных гелей.

2.5.2. Получение пепсина, иммобилизованного на стекле. Частицы стекла (содержащие 96% диоксида кремния, средний диаметр пор 550 мкм, размер частиц 40—60 меш) силанизируют γ-аминопропилтриэтоксисиланом [6]. Полученное алкиламиносилан-стекло промывают ацетоном и сушат на воздухе.

Приведем методику присоединения пепсина к аминостеклу.

1) 1 г стекла суспендируют в 10 мл воды, содержащей 50 мг пепсина.

2) Добавляют 40 мг метил-*п*-толуолсульфоната 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида, доводят pH до 4,0 (и поддерживают это значение pH) с помощью HCl (добавляют в течение 30 мин) при комнатной температуре.

3) Реакцию продолжают при 6 °С в течение ночи, затем отделяют сорбент путем фильтрования, тщательно промывают 0,01 М HCl и хранят во влажном (отжатом на фильтре) виде при 4 °С.

2.5.3. Иммобилизация пепсина на агарозе.

1) *Получение носителя.* Поперечно-сшитую агарозу (200 мг сухого носителя) активируют CNBr и вводят в реакцию с 100 мг *п*-фенилендиамина или 25 мг 4,4′-метилендианилина в 10 мл 0,1 М $NaHCO_3$. Через реакционную смесь в течение 15 мин пропускают азот и проводят реакцию в медленно вращающейся закрытой колбе в течение 16 ч в темноте при комнатной температуре. Промывают полимер в колонке следующими буферами: 0,1 М натрийборатным буфером с 1,0 М NaCl (рН 8,5; 24 ч); 0,1 М натрийацетатным буфером с 1,0 М NaCl (рН 4,5; 24 ч); 0,01 М натрийацетатным буфером (рН 4,5; 24 ч) и в заключение дистиллированной водой (4 ч). Хранят полимер в 0,01 М ацетатном буфере, содержащем NaN_3 (0,02% масс./об.).

2) *Присоединение пепсина.* Активированную агарозу (50 мг) в небольшом сосуде, соединенном с рН-метром для автоматического поддержания рН, суспендируют в 4 мл дистиллированной воды; добавляют 25 мкл ацетальдегида, 10—25 мг пепсина и 25 мкл изоцианида. Поддерживают рН 5,8 с помощью автоматического рН-метра (Radiometer, Копенгаген) в течение 6 ч. Промывают продукт на стеклянном фильтре G3 водой и затем в небольшой колонке следующими буферами: 0,1 М натрийцитратным буфером с 1,0 М NaCl (рН 4,0; 48 ч); 0,1 М натрийацетатным буфером с 1,0 М NaCl (рН 5,4; 24 ч) и в заключение 0,01 М натрийцитратным буфером (рН 4,0). Хранят продукты при 4 °С в 0,01 М цитрате натрия (рН 4,0), содержащем азид натрия (0,02% масс./об).

2.6. Иммобилизация аспартатаминотрансферазы

CNBr-активированную сефарозу 4В (0,5 г влажного носителя) смешивают с 1,0 мг аспартатаминотрансферазы, растворенной в 0,1 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (рН 7,0). Реакцию присоединения проводят в течение 16 ч при 4 °С. Иммобилизованный фермент тщательно промывают 0,1 М калийфосфатным буфером с рН 8,5 и затем буфером с рН 5,5.

2.7. Иммобилизация триптофаназы

CNBr-активированную сефарозу (10 мл) смешивают с 40 мг триптофаназы, растворенной в 0,1 М калийфосфатном буфере (рН 7,0; 5,0 мл). Смесь осторожно перемешивают в течение 24 ч при 4 °С. В результате этой реакции ~80% исходного количества белка иммобилизуется на сефарозе. Препарат иммо-

билизованного фермента при использовании в непрерывных ферментативных реакциях в течение 5 сут при 37 °С теряет за этот период лишь ~3% ферментативной активности.

2.8. Присоединение IgG кролика к гидразидным шарикам

Полистирольные шарики, содержащие гидразидные группы, поставляются фирмой Pierce Chemical Co.

1) К 4 г гидразидных шариков (~25 мл) прибавляют 5 мл 12,5%-ного раствора глутарового альдегида (2,5 мл 25%-ного раствора глутаральдегида разбавляют до 5 мл 0,1 *М* фосфатом натрия с рН 7,0).

2) Смесь встряхивают очень осторожно в течение 2 ч при комнатной температуре.

3) Промывают 100 мл воды на воронке Бюхнера (без фильтровальной бумаги), а затем 0,1 *М* фосфатом натрия (рН 6,0; 20 мл).

4) К раствору кроличьего IgG (2,5 мг в 5 мл 0,1 *М* фосфата натрия, рН 6,0) добавляют глутаральдегидактивированные шарики.

5) Добавляют 1 мг цианоборогидрида натрия (на этой стадии образованные выше шиффовы основания восстанавливаются до стабильных вторичных аминов).

6) Рекционную смесь осторожно встряхивают при комнатной температуре в течение ночи.

7) Полистирольные шарики с присоединенnным IgG промывают 0,1 *М* фосфатом натрия (рН 6,0; 50 мл), а затем 0,1 *М* бикарбонатом натрия (100 мл).

8) Полистирольные шарики с иммобилизованным IgG добавляют к 0,1 *М* бикарбонату натрия (5,0 мл), содержащему борогидрид натрия (~1 мг).

9) Смесь осторожно встряхивают в течение 15 мин (на этой стадии восстанавливаются непрореагировавшие с белком альдегидные группы).

10) Шарики с иммобилизованным IgG промывают 0,1 *М* карбонатом натрия (100 мл) и затем водой (100 мл).

11) IgG-содержащие шарики подсушивают на фильтровальной бумаге и хранят в сухом виде при 4 °С.

2.9. Использование колонок с силикагелем, содержащим иммобилизованный бычий сывороточный альбумин, для оптического расщепления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

С. Алленмарк, Б. Бомгрен (S. Allenmark, B. Bomgren)

Ниже приведены методики по применению колонок, упакованных БСА-силикагелем, в ВЭЖХ для аналитического расщепления некоторых рацемических веществ на энантиомеры. Для

исследователей, имеющих доступ к необходимому оборудованию и желающих изготовить собственные колонки, включено также описание методики упаковки колонок. После общего обзора метода ВЭЖХ и возможностей его применения приведены конкретные экспериментальные методики оптического расщепления ряда органических соединений. В заключение приведен перечень соединений, расщепленных к настоящему времени этим методом.

2.9.1. Введение. Сывороточные альбумины обычно относят к транспортным белкам организма, и исследование их связывающих свойств, т. е. «сродства» к различным эндогенным соединениям и лекарствам, вызывает интерес многих фармакологов и биохимиков. Исследование равновесия в растворах продемонстрировало энантиоселективные свойства альбуминов [7], но изучение возможностей, которые открывает применение этих свойств в хроматографии, началось лишь в самое последнее время [8—13]. Метод с использованием белка, такого, как бычий сывороточный альбумин (БСА), в качестве стационарной фазы в жидкостной хроматографии может быть отнесен к «обращенной» аффинной хроматографии, поскольку в этом случае иммобилизованным компонентом является белок, а не соответствующий низкомолекулярный лиганд. Первые работы с БСА, присоединенным к агарозе, в пластмассовых или стеклянных колонках и с использованием перистальтического насоса для подачи подвижной фазы дали возможность синтезировать в дальнейшем хроматографический материал для ВЭЖХ на основе силикагеля с размером частиц 10 мкм [14] (Resolvosil 10μ-БСА поставляет фирма Macherey-Nagal GmbH, ФРГ).

2.9.2. Основы метода. Удерживание на колонке (а для двух оптических изомеров во многих случаях различное удерживание) можно очень эффективно регулировать при помощи подвижной фазы, представляющей собой буферные системы с pH 4÷9. Энантиоселективные свойства стационарной фазы при связывании растворенного вещества могут быть обусловлены сочетанием кулоновых и гидрофобных взаимодействий, причем суммарный эффект на антиподы различен по стерическим причинам. Связывание со стационарной фазой и, следовательно, наблюдаемое удерживание на колонке могут сильно зависеть от pH и ионной силы, а также присутствия или отсутствия органического растворителя в подвижной фазе (рис. 1). Применяемые в настоящее время колонки имеют ограниченную емкость и могут использоваться только для аналитических разделений; количество вводимого растворенного вещества обычно составляет ~0,5÷5 нмоль.

2.9.3. Оборудование. Для разделений оптических изомеров необходимо обычное оборудование, комплектно поставляемое фир-

мами для ВЭЖХ. Можно использовать относительно недорогой насос высокого давления однопоршневого типа, но предпочтительно иметь к нему устройство, ослабляющее пульсацию. Стальная колонка, упакованная БСА-силикагелем, должна быть соединена с системой подачи растворителя, а также снабжена клапаном введения образца с петлей объемом 10 или 20 мкл. Выход колонки может быть соединен с различными типами детекторов (УФ-видимый, флуориметрический или электрохимический). Наиболее универсален УФ-детектор с переменной длиной

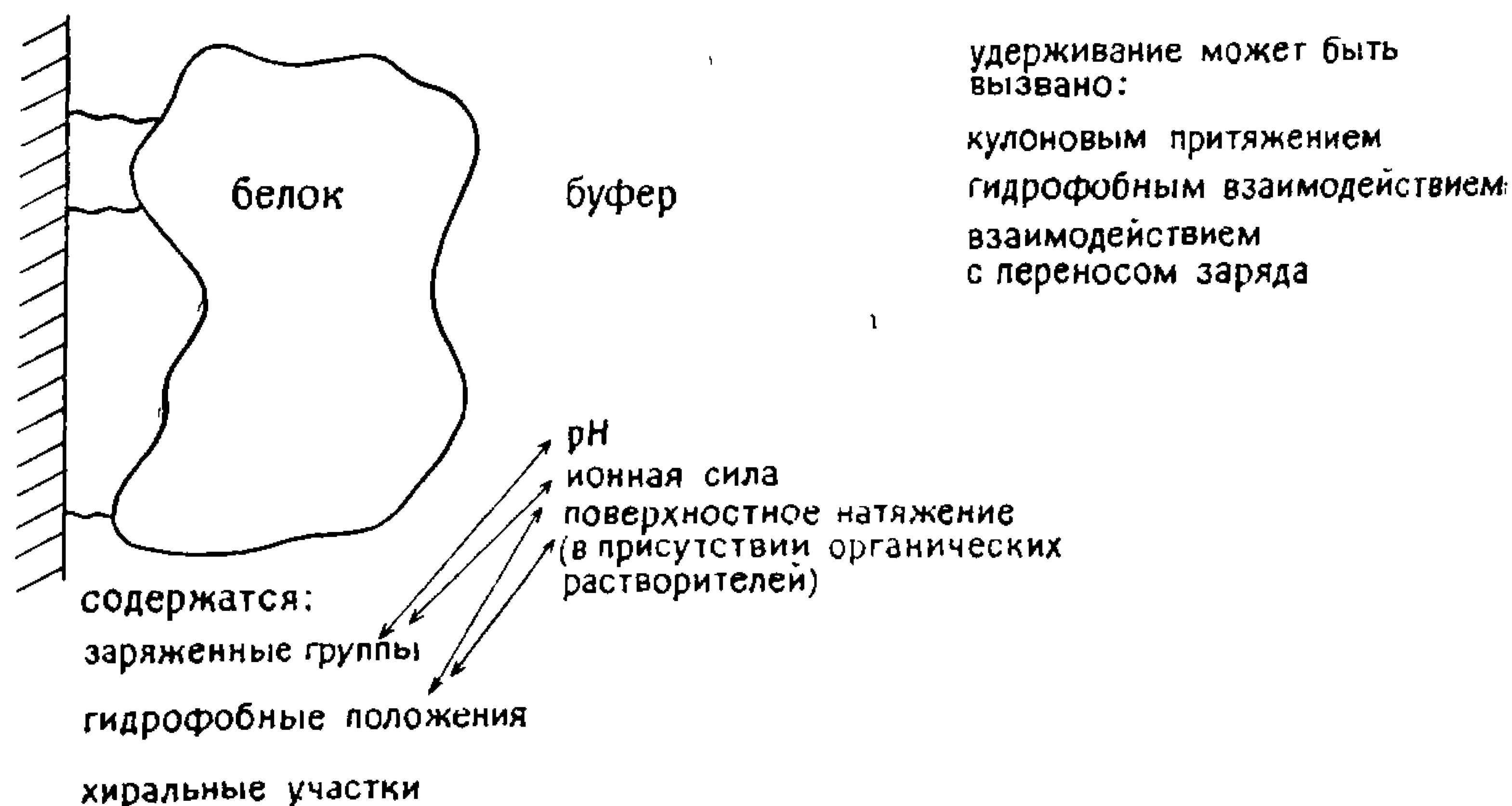


Рис. 1. Факторы, влияющие на удерживание на колонках с БСА-силикагелем.

волны, хотя в некоторых случаях, когда требуется очень высокая чувствительность, следует отдать предпочтение электрохимическому или флуориметрическому детектору. И наконец, система для ВЭЖХ обязательно должна включать одноканальный потенциометрический *X*—*Y*-самописец; при определении энантиомерного состава или оптической чистоты вводимых образцов рекомендуется пользоваться электронным интегратором для определения отношений площадей пиков. Полная схема хроматографической системы для ВЭЖХ показана на рис. 2. До сих пор все разделения на оптические изомеры осуществлялись путем изократного элюирования; поэтому нет необходимости введения в систему дополнительных устройств создания градиентного элюирования.

2.9.4. Упаковка колонок. Для упаковки аналитических колонок суспензионным методом [15] вполне удобно использовать насос, работающий на сжатом воздухе и соединенный с резервуаром из нержавеющей стали объемом ~75 мл.

1) Прежде всего тщательно очищают все части незаполненной аналитической колонки (размер 4÷5×150÷200 мм), пред-

почтительно использовать метанол или ацетон, а также ультразвуковую обработку.

2) После высушивания колонки ее собирают, но пока не присоединяют устройство для введения образца.

3) Отмеряют объем суспензии БСА-силикагеля, соответствующий ~2 г сухого сорбента (для колонки 4,6×150 мм), и диспергируют сорбент (в градуированном цилиндре) в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 1% (об./об.) 1-пропанола (75 мл).

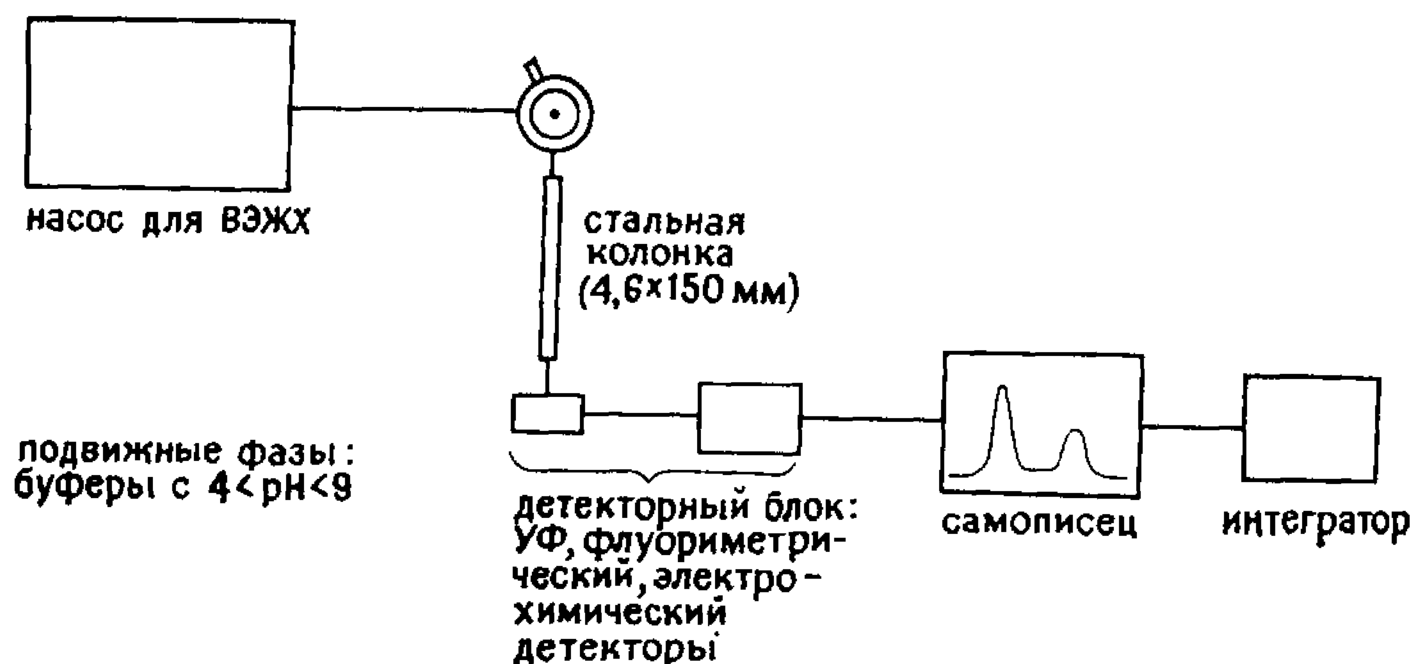


Рис. 2. ВЭЖХ-система для разделения оптических изомеров на колонках с БСА-силикагелем.

4) Оставляют суспензию в цилиндре на 20 мин и сливают сверху жидкую фазу. Добавляют буфер, если первая порция жидкости была заметно мутная (из-за мелких частиц). Промывание и отстаивание со сливом жидкости можно повторить, чтобы при работе колонки ее выход не забивался мелкими частицами.

5) Затем заполняют резервуар суспензией и соединяют его с входным отверстием колонки (колонка должна быть перевернута входным отверстием вниз).

6) Присоединяют подходящую трубку к выходу колонки для сбора растворителя.

7) Используя насос, подготовленный для подачи указанного выше фосфатного буфера, начинают упаковывать колонку при давлении ~340 бар, пока ~250 мл жидкости не пройдет через колонку.

8) После перевертывания колонки на 180° (входное отверстие вверху) насос останавливают и после уравновешивания давления (в течение 5 мин) резервуар отсоединяют, а колонку закрывают с помощью входного устройства. Колонку можно затем непосредственно установить в хроматографическую систему для уравновешивания подвижной фазой.

Рис. 3. Общая стратегия оптимального расщепления оптически активных соединений.

2.9.5. Экспериментальные методики для оптического расщепления.

1) *Предварительные эксперименты по расщеплению и методики оптимизации процессов.* Несмотря на то что ВЭЖХ на колонках с БСА-силикагелем никогда не станет универсальным методом оптического расщепления рацематов органических соединений, оказалось, что с помощью этого метода удалось разделить на энантиомеры (полностью или частично) неожиданно много соединений различных типов. В настоящее время мало что известно о взаимосвязи молекулярной структуры рацемического соединения с его энантиомерной избирательностью при связывании с БСА. По опыту авторов перспективными для таких экспериментов являются соединения, содержащие ароматические или полярные заместители (например, амидные, сложноэфирные, кето-, карбоксильные или сульфоксидные группы). Сильное удерживание на колонке не обязательно приводит к оптическому расщеплению [которое часто обусловлено преобла-

данием одного из взаимодействий [16]]; в случае некоторых быстро элюируемых соединений наблюдается полное разделение на оптические изомеры, в то время как многие сильно удерживаемые вещества не удалось разделить вовсе.

Для установления возможности расщепления конкретной рацемической смеси лучше всего прибегнуть к методике, схема которой изображена на рис. 3. Не следует использовать концентрации 1-пропанола выше 7%, что обычно и не требуется, за исключением очень гидрофобных соединений. Если нет признаков даже частичного расщепления при условиях, указанных на рис. 3, то эксперименты по разделению не имеет смысла продолжать. Если же наблюдается частичное расщепление, то, как правило, можно улучшить результаты путем дальнейшего изменения pH и/или ионной силы.

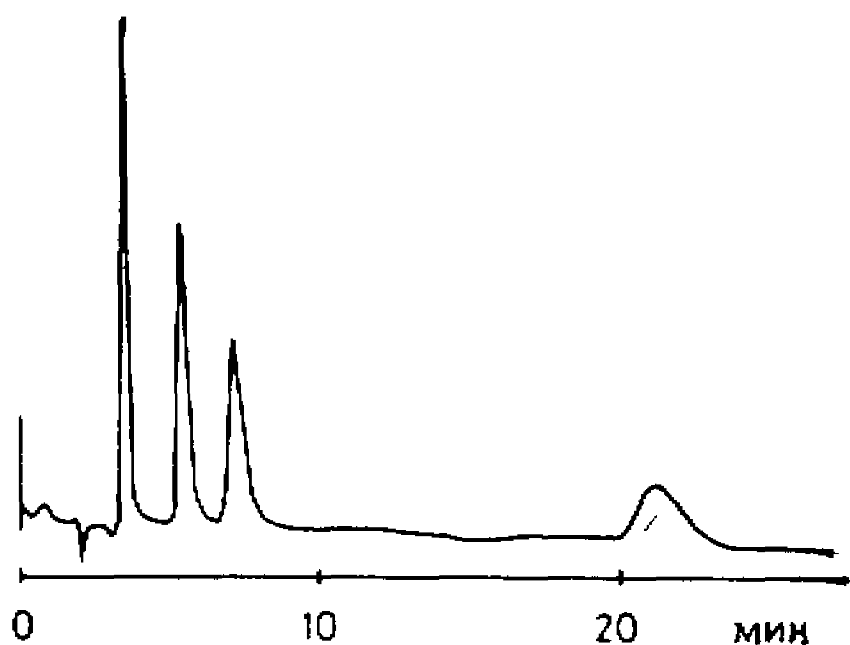


Рис. 4. Разделение смеси N-бензоил-DL-серина+N-бензоил-DL-аланина. Условия: 50 мМ фосфатный буфер (pH 5,7); 1,0 мл/мин; контроль в УФ-области при 225 нм; образец содержал по 40 мкмоль/л каждого компонента, введено 20 мкл.

2) *Методика разделения оптических изомеров.* Колонку уравновешивают соответствующей подвижной фазой. Поскольку сорбент реагирует довольно медленно на изменение подвижной фазы, для получения полностью воспроизводимых параметров удерживания требуется достаточное время для уравновешивания. В большинстве примеров для этого достаточно 1 ч. В процессе уравновешивания и хроматографического разделения целесообразно поддерживать скорость потока, равной 1,0÷1,5 мл/мин. Подвижную фазу в системе можно рециркулировать. Выбирают длину волны, подходящую для данного соединения. Готовят ~100 мкМ раствор рацемата в смешивающемся с водой растворителе (предпочтительно в подвижной фазе, но можно использовать также этиловый спирт, ацетон, диоксан и другие подобные растворители). Подготавливают к работе интегратор и подключают самописец (скорость сканирования 5 мм/мин). Вводят образец на колонку через петлю. Одновременно отмечают точку отсчета (начало эксперимента) на диаграммной бумаге и включают интегратор.

2.9.6. Примеры.

1) *N-ароил*-DL-*аминокислоты.* Аминокислоты могут быть превращены в N-ароилпроизводные реакцией с соответствующим ароилхлоридом в растворе карбоната натрия. Многие из этих производных легко расщепляются на энантиомеры [14]. Как правило, N-нафтоилпроизводные не элюируются с колонки в те-

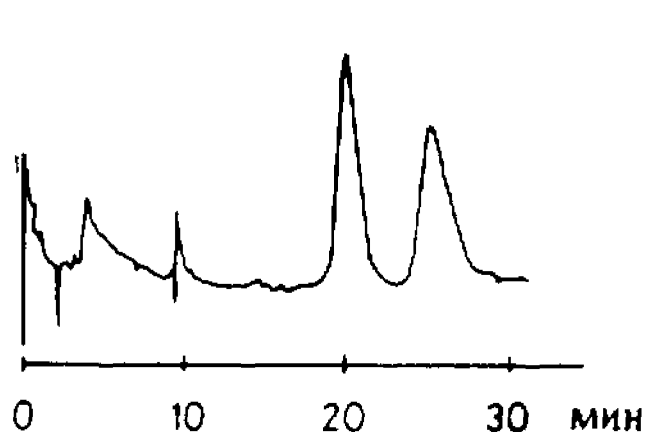


Рис. 5. Оптическое расщепление N-(2,4-динитрофенил)-DL-серина. Условия: 50 мМ фосфатный буфер (pH 5,7); 1,0 мл/мин; контроль в УФ-области при 254 нм; образец содержал 66 мкмоль/л; введено 10 мкл.

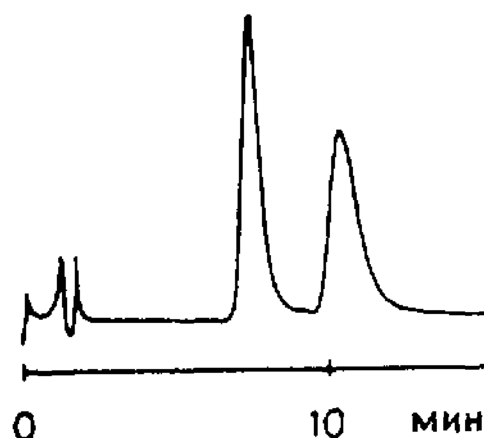


Рис. 6. Оптическое расщепление этилового эфира N-ацетил-DL-триптофана. Условия: 50 мМ боратный буфер (pH 8,25); 1,0 мл/мин; контроль при 225 нм; образец содержал 75 мкмоль/л; введено 10 мкл.

чение приемлемого отрезка времени, пока к подвижной фазе не добавляется ~5% (об./об.) 1-пропанола. Время удерживания увеличивается с уменьшением pH.

На рис. 4 приведены результаты оптического расщепления смеси N-бензоил-DL-серина + N-бензоил-DL-аланина.

2) *N-арил*-DL-*аминокислоты.* В качестве примеров для этой группы веществ выбраны N-(2,4-динитрофенил)-DL-аминокислоты, легко получаемые из 2,4-динитрофторобензола и соответст-

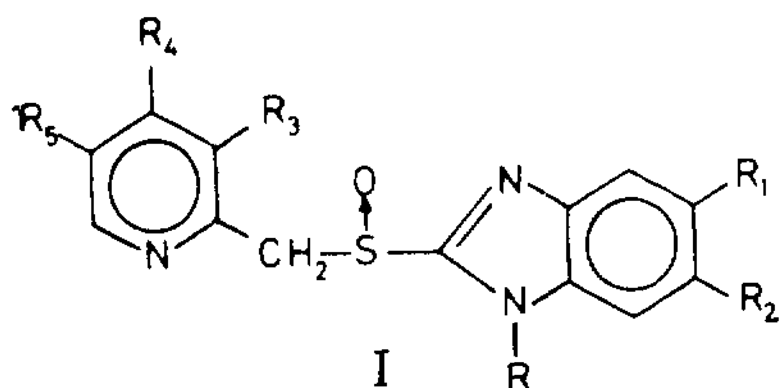


Рис. 7. Структура расщепляемых ароматических сульфоксидов.

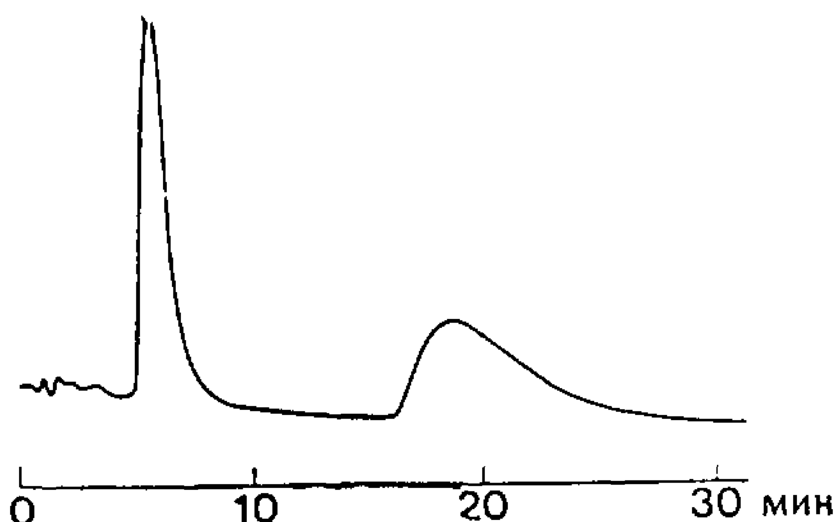


Рис. 8. Оптическое расщепление Iа ($R_1 = R_3 = R_5 = Me$, $R = R_2 = H$, $R_4 = CH_3O$) (рис. 7). Условия: 80 мМ фосфатный буфер (pH 5,80); 2,0 мл/мин; контроль в УФ-области при 225 нм; образец содержал 500 мкмоль/л, введено 10 мкл.

Таблица 1. Хиральные соединения, рацематы которых удалось полностью или частично разделить на энантиомеры на колонках с БСА-силикагелем

Аминокислоты	*Производные аминокислот*
Триптофан	N-Формилтриптофан
5-Гидрокситриптофан	N-Ацетилтриптофан
Кинуренин	Этиловый эфир N-ацетилтриптофана
3-Гидроксикинуренин	N-Бензоилсерин
Производные кумарина	N-(4-Нитробензоил)серин
Варфарин	N-(2,4-Динитрофенил)серин
Фенпрокумон	N-Бензоилаланин
Сульфоксиды	N-(4-Нитробензоил)аланин
Соединения, общая формула которых изображена на рис. 7:	N-(2,4-Динитрофенил)аланин
а) $R=H$, $R_3=R_5=CH_3$, $R_4=CH_3O$: $R_1=CH_3$, $R_2=H$; $R_1=MeO$, $R_2=H$; $R_1=R_2=H$; $R_1=Cl$, $R_2=H$; $R_1=Br$, $R_2=H$; $R_1=(CH_3)_2CH$, $R_2=H$; $R_1=(CH_3)_3C$, $R_2=H$; $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3OCO$	N-(2-Нафтоил)аланин
б) $R=H$, $R_3=R_5=H$, $R_4=CH_3$: $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3OCO$; 2-метилсульфинилбензойная кислота	N-(2-Теноил)аланин
	N-Бензоилфенилаланин
	N-(2-Нафтоил)фенилаланин
	N-Бензоилтреонин
	N-(2,4-Динитрофенил)треонин
	N-Бензоилметионин
	N-Бензоиллейцин
	N-(2,4-Динитрофенил)аспарагиновая кислота
	N-(2,4-Динитрофенил)глутаминовая кислота

вующей аминокислоты. Результаты оптического расщепления N-(2,4-динитрофенил)-DL-серина приведены на рис. 5.

3) *Производные триптофана.* Было показано, что из числа этих соединений хроматографией на колонках с БСА-силикагелем могут быть расщеплены наряду с DL-триптофаном также 5-гидрокси-DL-триптофан, N-формил- и N-ацетил-DL-триптофан и этиловый эфир N-ацетил-DL-триптофана [17]. Результаты полного оптического расщепления последнего приведены на рис. 6.

4) *Ароматические сульфоксиды.* Сульфоксиды, имеющие неодинаковые S-заместители, хиральны и поэтому могут быть расщеплены на оптические антиподы (рис. 7 и 8). Было показано, что соединения общего типа I ($R=H$) расщепляются на колонках с БСА-силикагелем [13, 18].

В табл. 1 приведен перечень соединений, успешно расщепленных к настоящему времени методом ВЭЖХ на БСА-силикагеле.

3. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛЕКТИНОВ

3.1. Иммобилизация лектинов проростков пшеницы на сефарозе

1 г (сухого вещества) CNBr-активированной сефарозы (методика активирования описана в гл. 3) инкубируют при 4 °С с осторожным перемешиванием в течение 24 ч с 25 мг агглютини-

на проростков пшеницы (АПП) в 0,1 M $NaHCO_3$, содержащем 0,5 M NaCl и хитиновые олигосахариды в концентрации 10—50 ммоль/л (содержание последних определено по восстанавливающим эквивалентам с использованием глюкозы в качестве стандарта). Оценить количество связывающегося лектина можно по разности, найдя содержание несвязавшегося с сефарозой белка (измерение поглощения при ~280 нм). С носителем должно связаться ~90—95% агглютинина проростков пшеницы. Хранят АПП-сефарозу при 4 °С в натрийфосфатном-NaCl-буфере, содержащем азид натрия (0,5% масс./об.) и N-ацетил-D-глюкозамин (0,1 моль/л).

3.1.1. Конденсация с агарозой.

1) CNBr-активированные агарозные шарики промывают на воронке Бюхнера 5—6 объемами ледяной дистиллированной воды и затем 0,5 M $NaHCO_3$ (pH 8,5).

2) Добавляют раствор лектина в 0,5 M $NaHCO_3$.

3) Осторожно перемешивают или лучше встряхивают суспензию в течение ночи при комнатной температуре. В результате получают гель, содержащий 1—5 мг лектина/г влажного геля.

4) Непрореагировавшие активные группы блокируют путем подобной же обработки насыщенным раствором глицина в течение 24 ч. Ионогенная карбоксильная группа глицина экранируется благодаря наличию основной иминогруппы в имидокарбонате.

5) Полученный адсорбент с иммобилизованным лектином тщательно промывают и уравновешивают 20—50 мМ фосфатным буфером (pH 7,2), содержащим 0,15 моль/л NaCl.

6) Наносят хроматографируемый образец и промывают колонку уравновешивающим буфером, пока поглощение в элюате при 280 нм не вернется к фоновому значению.

7) Связавшийся материал элюируют в колонке тем же буфером, содержащим 0,1÷0,3 M соответствующего сахара.

3.1.2. Иммобилизация растительных лектинов на агарозе. После активации 40 мл агарозы бромцианом CNBr (6 г) добавляют к гелю 60 мл ледяного 0,1 M фосфата натрия (pH 7,4), содержащего конканавалин А (500 мг) и α-метил-D-маннопиранозид (0,1 M). Через 16 ч при 4 °С добавляют глицин (2 г) и продолжают инкубацию в течение 8 ч при комнатной температуре. Полученный адсорбент содержит 5,5 мг белка/мл геля. Аналогично присоединяют к активированной агарозе агглютинин проростков пшеницы (1,4 мг/мл) в присутствии 0,1 M N-ацетил-D-глюкозамина; на 1 мл геля присоединяется 1,1 мг белка.

3.2. Иммобилизация гепарина

3.2.1. Иммобилизация гепарина на эупергите С.

1) Готовят раствор гепарина (Sigma, марки 1, из слизистой оболочки кишечника свиньи) (100 мг) в воде (6 мл) и доводят до pH 10÷11 путем добавления 1,0 М NaOH.

2) Общий объем доводят до 8 мл и добавляют этот раствор к эупергиту С (2,0 г).

3) Смесь выдерживают без дальнейшего перемешивания в течение 24 ч при комнатной температуре, затем промывают водой до нейтрального pH.

4) При необходимости удаляют оставшиеся оксирановые группы обработкой меркаптоэтанолом (см. гл. 1).

3.2.2. Гепарин-ультрогель. Гепарин-ультрогель A4R сочетает в себе свойства обычного растворимого гепарина со свойствами ультрогеля A4 (шарики 4%-ной агарозы) и поставляется фирмой Reactifs IBF. В работе используют гепарин, полученный из слизистой оболочки кишечника свиньи и очищенный с сохранением полной биологической активности. Он имеет молекулярную массу ~10000 и активность >150 USP Е/мг. Предел исключения матрицы ультрогеля A4 составляет несколько миллионов, что дает возможность использовать гепарин-ультрогель A4R для очистки соединений с очень большой молекулярной массой, таких, как липопротеины сыворотки.

Иммобилизация гепарина на носителе осуществляется с помощью конденсирующего агента ЭЭДХ через шестиуглеродную вставку. Последняя присоединяется к носителю после активации и поперечной сшивки шариков агарозы эпихлоргидрином. Полученный комплекс чрезвычайно устойчив даже в присутствии сильных диссоциирующих агентов. 1 мл геля содержит 4—6 мг иммобилизованного гепарина с активностью 600—900 USP Е/мл.

Использование гепарин-сефарозы в аффинной хроматографии описано далее в разд. 5.

4. ОЧИСТКА γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИММУНОАФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

А. Шевчук, Э. Прусак (A. Szewczuk, E. Prusak)

4.1. Введение

γ-Глутамилтрансфераза (γ-глутамилтранспептидаза, GGT, КФ 2.3.2.2) катализирует перенос γ-глутамильной группы от различных доноров, включая глутатион, к многочисленным аминокислотным и пептидным акцепторам. Она также катализирует гидролиз соединений, содержащих γ-глутамильную группу. GGT — гетеродимерный мембранный гликопротеин, который мо-

жет быть солюбилизирован с помощью ПАВ с получением «тяжелой» формы, либо протеолитическим гидролизом с получением «легкой» формы фермента [19, 20].

Описано много методов очистки различных форм GGT из разных тканей и жидкостей организма; как правило, все предлагаемые методики многостадийны, а выходы относительно низкие. Кроме того, GGT вследствие различий в содержании углеводов и сиаловой кислоты имеет мультимолекулярные формы с различными изоэлектрическими точками, которые плохо разделяются ионообменной хроматографией или аффинной хроматографией на иммобилизованном конканавалине А. Поэтому очистка различных форм GGT с применением иммуноаффинной хроматографии представляется эффективным альтернативным методом.

4.2. Некоторые вспомогательные методики

4.2.1. Определение активности GGT. Активность γ-глутамилтрансферазы определяют спектрофотометрически, используя в качестве субстрата γ-L-глутамил-*п*-нитроанилид, а в качестве акцептора — глицилглицин [21]. Раствор субстрата содержит: 5 мМ γ-L-глутамил-*п*-нитроанилид (13,3 мг в 10 мл) и 50 мМ глицилглицин (66 мг в 10 мл) в 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,6). К 0,4 мл раствора субстрата добавляют 0,1 мл разбавленного препарата GGT (0,005÷0,2 Е) и инкубируют смесь при 37 °С в течение 1—10 мин. Для остановки ферментативной реакции добавляют 1,0 М уксусную кислоту (2 мл) и измеряют оптическую плотность при 407 нм против контрольного образца, полученного тем же способом, но с введением GGT после добавления уксусной кислоты. Строят градуировочный график для определения содержания *п*-нитроанилина (0÷0,2 мкмоль). Ферментативную активность указывают в единицах, равных количеству мкмолей образующегося *п*-нитроанилина в 1 мин.

4.2.3. Гель-электрофорез. Электрофорез в полиакриламидном меряют колориметрически с реагентом Фолина [22]; для построения градуировочного графика используют растворы, приготовленные из кристаллического бычьего сывороточного альбумина. Если белковый образец содержит тритон Х-100 к анализируемой пробе добавляют додецилсульфат натрия [23].

4.2.3. Гель-электрофорез. Электрофорез в полиакриламидном геле [на 7%-ном (масс./об.) геле] проводят, как описано в работе [24]: гели окрашивают на белок по методике [24] или на GGT-активность с применением флуоресцентного метода, используя в качестве субстрата 7-(γ-L-глутамил)-4-метилкумариламид [25]. Готовят флуорогенный субстрат растворением 7-(γ-

-глутамил)-4-метилкумариламида (1,2 мг) в 2,0 М NaOH (0,02 мл), разбавляют его 50 мМ глицилглицином в 0,1 М трис-HCl-буфере (pH 7,8; 10 мл). Гели с флуорогенным субстратом инкубируют; 7-амино-4-метилкумарин, образующийся при действии GGT, обнаруживают визуально при УФ-облучении в виде ярко-синей полосы.

4.2.4. Двойная иммунодиффузия. Используют 1,2%-ные (масс./об.) агаровые гели для двойной иммунодиффузии [26]. После образования дуг преципитации гели промывают буфером (0,15 М NaCl в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4) в течение 3 сут, а затем окрашивают, как описано для полиакриламидных гелей.

4.2.5. Антигены. Антигены, используемые для иммунизации, должны быть очень хорошо очищены, для чего можно использовать метод иммуноаффинной хроматографии или «классические методы». Чистая GGT из почек быка может быть выделена солюбилизацией фермента в присутствии дезоксихолата натрия с последующей обработкой *н*-бутанолом, фракционированием сульфатом аммония и хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [27]. Полученный после разделения на сефарозе 6В препарат GGT подвергается протеолитическому гидролизу бромелаином, и полученная GGT (легкая форма) очищается электрофорезом в полиакриламидном геле [28]. Чистая GGT из почек крысы (фермент III) может быть получена [29] подобным методом.

4.3. Получение и выделение антител

Поликлональные антитела против GGT почек быка или GGT почек крысы (легкие формы) могут быть получены иммунизацией кроликов (самки, возраст 6—8 нед) путем инъекций в подушечки задних лап эмульсии, состоящей из 50 мкг фермента в 0,5 мл NaCl-натрийфосфатного буфера с 0,5 мл полного стимулятора Фрейнда на животное. Через 2 нед вводят то же количество антигена (50 мкг GGT в 0,5 мл того же буфера), хорошо эмульгированного неполным стимулятором Фрейнда, подкожно в несколько мест шеи. Целесообразно повторить последнее введение еще через 2 нед. Через 10—15 сут берут пробы крови кролика; инкубируют взятые пробы при 37 °С в течение 2 ч, затем оставляют на ночь при 4 °С и отделяют антисыворотку центрифугированием при 3000 *g* в течение 30 мин. В анализах методом двойной иммунодиффузии антисыворотка при разбавлении 1 : 128 (NaCl-фосфатным буфером) все еще дает дуги преципитации с разбавленной GGT (0,025 мг/мл).

Фракция иммуноглобулинов G (IgG) может быть выделена из антисыворотки по методике, описанной ниже [30].

1) Сыворотку доводят до 50%-ного насыщения сульфатом аммония (31,3 г на 100 мл).

2) Через 1 ч осажденный белок отделяют путем центрифугирования (10000 *g* в течение 60 мин) и растворяют в небольшом объеме 10 мМ фосфата калия (pH 6,8).

3) Перед добавлением соли доводят объем раствора до первоначального объема антисыворотки и проводят повторное осаждение фракции иммуноглобулинов путем добавления твердого сульфата аммония до 50%-ного насыщения.

4) Осажденный белок растворяют в небольшом объеме 10 мМ фосфата калия (pH 6,8) и проводят диализ раствора против 100 объемов 10 мМ фосфата калия (pH 6,8), трижды заменяя буфер.

5) Для дальнейшей очистки образец пропускают через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (DE-52, Whatman), предварительно уравновешанной 10 мМ фосфатом калия (pH 6,8), используя 5—8 мл упакованной целлюлозы на 1 мл фракционируемой антисыворотки.

6) Промывают колонку уравновешивающим буфером и собирают фракции. IgG не задерживается на колонке с целлюлозой; IgG-содержащие фракции идентифицируют по поглощению при 280 нм, принимая поглощение 0,1%-ного раствора при длине кюветы 1 см за 1,45. Фракции с концентрацией IgG>0,5 мг/мл объединяют и концентрируют (по крайней мере в 30 раз) путем ультрафильтрации. Полученные таким образом препараты антител можно хранить при —20 °С без значительной потери иммунологической активности в течение нескольких месяцев. Используя эту методику, можно получать 400—600 мг IgG из одного кролика.

4.4. Получение иммуноадсорбентов. Общая методика

Иммуноадсорбент может быть получен иммобилизацией полученного по вышеописанной методике препарата антител на CNBr-активированной сефарозе [31].

1) 10 г суспензии сефарозы 4В (Pharmacia, Швеция) промывают три раза дистиллированной водой на стеклянном фильтре, затем переносят в химический стакан и суспендируют в 2,0 М карбонате натрия (10 мл) путем перемешивания на магнитной мешалке (*вытяжной шкаф*!).

2) Сразу добавляют раствор бромоциана (1 г в 1 мл ацетонитрила) и энергично перемешивают 2 мин при комнатной температуре.

3) Переносят суспензию на фильтровальную воронку и быстро промывают с отсасыванием ледяной деионизованной водой (100 мл) и затем 0,25 М карбонатным буфером (pH 9,5; 100 мл).

4) Гель быстро переносят в колбу (50—75 мл), содержащую

150 мг антител в 0,25 М карбонатном буфере (pH 9,5; 10 мл).

5) Для поддержания геля в суспендированном состоянии осторожно встряхивают колбу при 4 °C в течение 16 ч.

6) Гель отфильтровывают и промывают карбонатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl; для разрушения оставшихся активных групп гель выдерживают в трис-HCl-буфере (pH 8,6; 50 мл) в течение 2 ч при комнатной температуре*.

7) Вновь промывают гель 0,25 М карбонатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, и затем NaCl-натрийфосфатным буфером, содержащим азид натрия (0,02% масс./об.). Гель можно хранить при 4 °C в течение нескольких недель без заметного уменьшения активности иммобилизованных антител.

4.5. Очистка GGT (легкая форма) из тканей животных

Метод основан на расщеплении под действием бромелаина твердого остатка, полученного после центрифугирования при 100000 *g* тканевого гомогената; полученный таким образом растворимый фермент далее очищают с помощью аффинной хроматографии на колонке со специфическим иммуноадсорбентом.

4.5.1. Растворимый препарат GGT (легкая форма). Свежие ткани (почки, печень, гепатома) крыс и мышей получают после декапитации животных. Ткани быка получают со скотобойни. При —20 °C ткани можно хранить в течение нескольких месяцев без потери GGT-активности.

1) После оттаивания ткани пропускают через мясорубку и гомогенизируют с холодным NaCl-натрийфосфатным буфером в гомогенизаторе Waring Blendor, используя 4 объема буфера на объем ткани.

2) Жидкую кашицу центрифугируют (3000 *g*) в течение 15 мин и осадок отбрасывают; остаток кашицы вновь центрифугируют (100000 *g*) при охлаждении в течение 60 мин.

3) Отделенный твердый остаток суспендируют в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 ммоль/л ЭДТА (~5 объемов).

4) Доводят концентрацию белка в суспензии до ~20 мг/мл путем добавления фосфатного буфера, содержащего ЭДТА, и прибавляют 2-меркаптоэтанол до концентрации в конечном растворе 10 ммоль/л.

5) Добавляют бромелаин (Sigma, удельная активность 2310 Е/мг) в количестве 1 мг на 10 мг белка и инкубируют сус-

* Маловероятно, чтобы обработка геля трис-HCl-буфером (pH 8,6) в указанных условиях обеспечивала полное разложение или блокирование активных групп на сефарозе (см., например, далее разд. 6). Целесообразнее блокировать остаточные активные группы стандартной обработкой геля 1 М этаноламином (pH 8÷9). — *Прим. перев.*

пензию при 37 °C: для солюбилизации GGT из почек и гепатомы в течение 3 ч; для солюбилизации GGT из печени быка в течение 15 ч.

6) Полученную суспензию центрифугируют (100000 *g*) в течение 60 мин. Жидкую фазу после центрифугирования, которая содержит солюбилизированную GGT, можно хранить до дальнейшей очистки при —30 °C.

4.5.2. Иммуноаффинная хроматография.

1) Колонку упаковывают суспензией иммуноадсорбента и промывают несколькими объемами NaCl-натрийфосфатного буфера. Используют колонки с упакованными иммуноадсорбентами объемом 5 мл (1,2×4,5 см) или 1,5 мл (0,8×3 см).

2) К препарату солюбилизированной GGT добавляют хлорид натрия (85 мг/10 мл), пропускают раствор через колонку с иммуноадсорбентом при комнатной температуре и собирают фракции (по 5 мл или 1 мл при скорости потока 40 или 10 мл/ч соответственно).

3) Наносят ~1000 ед. GGT почек крысы на 1 мл иммобилизованных антител против GGT почек крысы и 400 ед. GGT почек быка на 1 мл иммобилизованных антител против GGT почек быка. Фракции, содержащие GGT, не связавшуюся с иммуноадсорбентом, можно хроматографировать повторно.

4) Промывают колонку NaCl-натрийфосфатным буфером (10 объемов) и элюируют GGT либо 0,1 *М* этаноламином (скорость потока 10 и 3 мл/ч), либо деионизованной водой (скорость потока ~2 и 0,5 мл/ч).

5) Фракции, элюированные этаноламином, следует нейтрализовать 0,5 *М* уксусной кислотой по фенолфталеину [добавляют 1 каплю 0,1%-ного (масс./об.) спиртового раствора индикатора]; для определения GGT-активности отбирают пробы небольшого объема (1÷10 мкл).

6) Объединяют фракции с активностью, превышающей 2 ед./мл; полученный раствор вновь хроматографируют для повторной очистки или концентрируют путем ультрафильтрации.

4.5.3. Повторная хроматография однократно очищенного препарата GGT. К препарату GGT, элюированному с иммуноадсорбентов, добавляют хлорид натрия (85 мг/10 мл) и вновь хроматографируют материал в условиях, описанных в разд. 4.5.2. Благодаря этой операции увеличивается удельная активность очищенной GGT, как показано для GGT почек быка и GGT почек мыши (табл. 2 и 7).

4.5.4. Регенерация иммуноадсорбентов. Колонки с иммуноадсорбентами после элюирования GGT могут быть регенерированы путем промывания 0,2 *М* глицин-HCl-буфером (pH 2,2; 10 объ-

Таблица 2. Очистка GGT (легкая форма) из 400 г почек быка

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	1300	31200	10920	0,35	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	360	7380	10260	1,4	4	94
После солюбилизации с бромелаином	275	1790	7840	4,4	12,6	72
Элюат с иммуноадсорбента[a]	33	6,9	5915	850	2430	54
Элюат после повторной хроматографии[a]	24	4,0	5030	1230	3515	46

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек быка (три колонки по 5 мл). Элюирование GGT 0,1 М этаноламином.

емов), а затем NaCl-натрийфосфатным буфером. Регенерированные подобным образом иммуноадсорбенты можно использовать несколько раз без заметной потери связывающих свойств.

4.6. Примеры

4.6.1. GGT из почек быка. Легкая форма GGT из почек быка может быть очищена по общей методике, описанной в разд. 4.5. Более высокая удельная активность достигается после повторной хроматографии фермента, элюированного с колонки с иммуноадсорбентом (иммобилизованные антитела против GGT почек быка). Продукт показывает 2500÷3500-кратное увеличение GGT-активности по сравнению с гомогенатом. Выход очищенного фермента достигает 46%. Данные по очистке суммированы в табл. 2, а кривая элюирования с колонки с иммуноадсорбентом приведена на рис. 9.

Для очистки тяжелой формы GGT из почек быка используется следующая методика.

1) GGT солюбилизируют с помощью 0,5%-ного (об./об.) тритона X-100, выдерживая смесь в течение 3 ч при комнатной температуре; нерастворившийся остаток отделяют путем центрифугирования (100 000 *g*) в течение 60 мин.

2) Жидкую фазу отделяют и очищают на одной колонке с иммуноадсорбентом (иммобилизованные антитела против легкой формы GGT из почек быка).

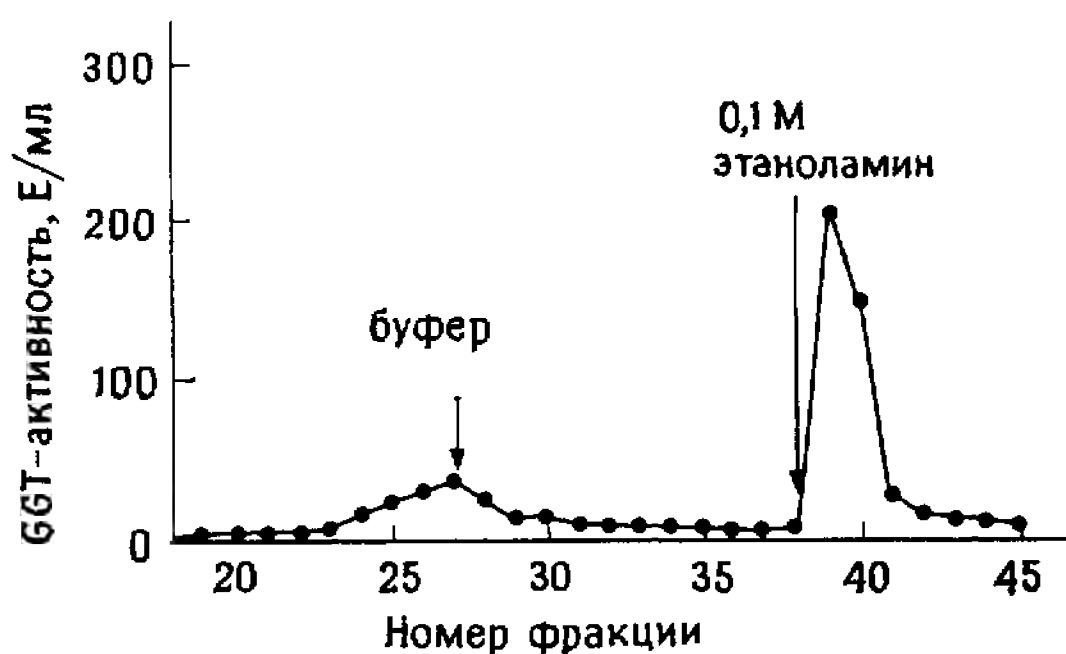


Рис. 9. Кривая элюирования GGT (легкая форма) из почек быка с иммуноадсорбента — иммобилизованных антител против GGT из почек быка. 140 мл супернатанта (4000Е) после ферментативного гидролиза твердого остатка (после центрифугирования при 100 000 *g*) бромелаином пропускали через колонку с иммуноадсорбеитом (1,2×4,5 см), собирая фракции по 5 мл (скорость потока 50 мл/ч). Колонку промывали NaCl-натрийфосфатным буфером и затем 0,1 *М* этаноламином (10 мл/ч).

3) Колонку промывают NaCl-натрийфосфатным буфером, а затем 0,1 *М* этаноламином в 0,05%-ном (об./об.) тритоне Х-100.

В результате очистки достигается 860-кратное увеличение активности препарата GGT. Суммарный выход очищенного препарата составляет 44,5%. Данные по очистке суммированы в табл. 3.

4.6.2. GGT из печени быка. Легкая форма фермента из печени быка может быть очищена по общей методике, описанной выше.

Таблица 3. Очистка GGT (тяжелая форма) из 80 г почек быка

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	260	6240	2180	0,35	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	72	1480	2050	1,4	4	94
После солюбилизации тритоном Х-100	60	710	1350	1,9	5,4	62
Элюат с иммуноадсорбента[a]	16	3,2	970	300	860	44,5

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек быка (легкая форма) (две колонки по 5 мл). Элюирование GGT 0,1 *М* этаноламином в 0,5%-ном тритоне Х-100.

Достигается ~23000-кратное увеличение ферментативной активности при общем выходе 32%. Данные по очистке суммированы в табл. 4.

4.6.3. GGT из коровьего молока. Для очистки легкой формы GGT можно использовать иммуноадсорбент (иммобилизованные антитела против GGT из почек быка).

1) pH свежего молока со снятыми сливками доводят до 4,6 путем добавления 1,0 М уксусной кислоты; перемешивают 1 ч при комнатной температуре.

Таблица 4. Очистка GGT (легкая форма) из 400 г печени быка

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	1400	58 650	1953	0,033	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	360	19 800	1407	0,071	2,1	72
После солюбилизации с бромелаином	310	3100	1116	0,36	10,8	57
Элюат с иммуноадсорбента[a]	32	0,89	625	750	22730	32

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек быка (колонка 5 мл). Элюирование GGT 0,1 М этаноламином.

2) Осажденный казеин удаляют путем центрифугирования (3000 *g* в течение 15 мин); полученную сыворотку вновь центрифугируют (100 000 *g* в течение 60 мин).

3) Отделяют твердый остаток и проводят протеолиз бромелаином.

Солюбилизированная GGT молока может быть далее очищена на иммуноадсорбенте, как подробно описано в разд. 4.5. Фермент, элюированный водой, показывает активность в ~13000 раз большую, чем в молоке со снятыми сливками. Суммарный выход очищенного препарата 15%. Данные по очистке приведены в табл. 5.

4.6.4. GGT из почек крысы. Для очистки легкой формы *GGT* из почек крысы можно воспользоваться описанной выше методикой для проведения иммуноаффинной хроматографии на иммобилизованных антителах против GGT из почек крысы. Фермент, элюированный водой, обладает в 330 раз большей активностью, чем исходный гомогенат при суммарном выходе 46%. Данные по очистке суммированы в табл. 6.

Таблица 5. Очистка GGT (легкая форма) из молока коровы

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Молоко со снятыми сливками	1800	46 800	4030	0,086	1	100
Сыворотка	1500	9 900	3000	0,3	3,5	74
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	46	270	1980	7,35	85,5	49
После солюбилизации бромелаином	43	194	1815	9,37	109	44
Элюат с иммуноадсорбента[a]	19	0,57	617	1090	12 675	15

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек быка (две колонки по 5 мл). Элюирование GGT водой.

Таблица 6. Очистка GGT (легкая форма) из 72 г почек крысы

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход %
Гомогенат	250	2520	10 080	4	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	27	158	6 650	42	10,5	66
После солюбилизации бромелаином	25	66	6 250	95	23,8	62
Элюат с иммуноадсорбента[a]	24	3,5	4 680	1320	330	46

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек крысы (две колонки по 5 мл). Элюирование водой.

4.6.5. GGT из почек мыши. Чувствительный электрофоретический метод разделения смеси GGT-антител позволяет продемонстрировать сильное иммуновзаимодействие между GGT из почек мыши и антителами против GGT из почек крысы. Это подтверждает возможность использования иммобилизованных антител против GGT из почек крысы в качестве иммуноадсорбента для очистки GGT из почек мыши. Данные по очистке фермента из почек мыши суммированы в табл. 7. Подробная методика во многом аналогична описанной выше общей методике. После повторной хроматографии активность GGT увеличивается в ~530 раз при суммарном выходе 35%.

Таблица 7. Очистка GGT (легкая форма) из 17 г почек мыши

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	65	2340	2500	12,1	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	40	900	2160	2,4	2,2	86
После солюбилизации бромелаином	34	365	2000	5,8	5,1	80
Элюат с иммуноадсорбента[a]	14	2,9	1360	475	432	54
Элюат после повторной хроматографии[a]	12	1,5	870	500	535	35

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек крысы (две колонки по 5 мл). Элюирование GGT 0,1 М этаноламином.

4.6.6. GGT из гепатомы крысы. Используя описанную выше методику, можно очистить также легкую форму GGT из гепатомы Морриса 5123 D. Клетки гепатомы взяты у крыс Буффало через 24 сут после имплантации небольшого количества гепатомной пульпы в заднюю ногу [33]. Фермент гепатомы может быть элюирован с иммуноадсорбента (иммобилизованные антитела против GGT из почек крысы) водой. Для чистого фермента установлено повышение активности в 18 500 раз по сравнению с исходным гомогенатом при суммарном выходе 23%. Данные по очистке суммированы в табл. 8.

Таблица 8. Очистка GGT (легкая форма) из 180 г гепатомы Морриса 5123 D

Препарат	Объем препарата, мл	Содержание белка, мг	Полная активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	800	17 200	640	0,04	1	100
Суспензия остатка после центрифугирования при 100 000 *g*	150	3 820	384	0,1	2,5	60
После солюбилизации бромелаином	130	1 315	290	0,2	5	46
Элюат с иммуноадсорбента[a]	4	0,2	150	740	18 500	23

[a] Иммобилизованные антитела против GGT из почек крысы (колонка 1,5 мл). Элюирование GGT водой.

4.7. Заключительные замечания

При анализе методом двойной иммунодиффузии препарат GGT, очищенный из почек быка с применением иммуноаффинной хроматографии, дает с гомологичными антителами три отдельные дуги преципитации, каждая из которых проявляет GGT-активность. Ферментный препарат может быть также разделен на четыре активные фракции изоэлектрическим фокусированием. GGT из почек крысы, очищенная на иммуноадсорбенте, дает с гомологичными антителами две дуги преципитации, обладающие ферментативной активностью. Эти наблюдения подтверждают предположение, что GGT присутствует в виде нескольких молекулярных форм, которые могут отличаться по содержанию сиаловой кислоты. Тэйт и Мейстер [34] впервые продемонстрировали, что чистая легкая форма GGT из почек крысы может быть разделена на несколько ферментных форм. Эти наблюдения делают очевидным тот факт, что молекулярные формы, очищенные на иммуноадсорбентах, иммунологически неразличимы.

5. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ГЕПАРИН-СЕФАРОЗЕ И КАЗЕИН-СЕФАРОЗЕ ДЛЯ ОЧИСТКИ И РАЗДЕЛЕНИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ И ПРОТЕИНКИНАЗ

Г. Мушинска, Э. Бер, Г. Добровольска
(G. Muszynska, E. Ber, G. Dobrowolska)

5.1. Введение

Несмотря на то что гепарин — общий лиганд для аффинной хроматографии, возможности его применения еще должны быть полностью оценены. Гепарин — кислотный мукополисахарид, который взаимодействует с основными группами на поверхности многих белков, и его линейная структура может имитировать структуру нуклеиновых кислот. Способность гепарина ингибировать ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот, была использована для очистки на гепарин-агарозе ДНК- и РНК-полимераз [35—42], рестриктирующих эндонуклеаз [43] и факторов белкового синтеза [44]. Недавно было показано [45], что гепарин-агароза может быть использована для одновременного разделения и очистки различных типов протеинкиназ и различных классов ДНК-зависимых РНК-полимераз. При этом РНК-полимераза I элюировалась вместе с казеинкиназой. Для разделения этих ферментов был использован казеин, ковалентно связанный с сефарозой. Казеинкиназы представляют собой киназы, фосфорилирующие серильные и треонильные остатки в

кислотных областях поверхности белков. Поскольку казеин не является природным субстратом рассматриваемых здесь ферментов, биологическая роль этих киназ остается неясной. Имеются предположения, что некоторые из них могут принимать участие в фосфорилировании РНК-полимераз [35], влияя на регуляцию синтеза нуклеиновых кислот.

Ниже описаны методы с использованием иммобилизованных гепарина и казеина для очистки и разделения двух классов РНК-полимераз и различных типов протеинкиназ.

5.2. Основные экспериментальные методики

5.2.1. Получение экстрактов ферментов. Зерна кукурузы замачивают на 12 ч и проращивают в течение 48 ч в темноте при 26 °С; отделяют проростки семян. Собранный материал можно хранить в жидком азоте.

Для выделения ферментов используют следующую методику.

1) Замороженные проростки (20 г) и стеклянные шарики (3—4 г) помещают в ступку и тщательно растирают пестиком при добавлении небольшого количества жидкого азота.

2) После испарения жидкого азота к полученному порошку медленно добавляют 40 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,9), 6 мМ $MgCl_2$, 0,05%-ный (масс./об.) монотиоглицерин, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (для ингибирования протеазной активности) и 250 мМ сульфат аммония. Смесь перемешивают.

3) Гомогенат центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 10 мин.

4) Супернатант помещают в ледяную баню, а твердый остаток суспендируют в 20 мл буфера и воздействуют на суспензию ультразвуком (3 раза по 40 с).

5) Суспензию центрифугируют, как описано выше, и объединяют супернатанты от обоих центрифугирований.

6) Из полученного раствора белки осаждают путем медленного добавления твердого сульфата аммония до концентрации 2,2 моль/л при постоянном перемешивании раствора на магнитной мешалке.

7) Через 1 ч осадок отделяют с помощью центрифугирования при 5000 об/мин в течение 45 мин.

8) Твердый остаток смешивают с сульфатом аммония, используя гомогенизатор Поттера и буфер А (табл. 9); проводят центрифугирование при 10 000 об/мин в течение 15 мин и отделяют супернатант; этот материал служит в качестве исходного при получении чистого фермента.

5.2.2. Определение ферментативной активности и содержания белка.

Определение активности протеинкиназы. Доводят конечный объем до 0,1 мл; 25 мМ трис-HCl (рН 7,9), 20 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мг/мл казеина, 20 мкМ [^{32}P] АТР [100—200 имп/(мин·пкмоль)]. Добавляют 40 мкл препарата протеинкиназы. Инкубируют в течение 20 мин при 37 °С; для прекращения реакции из смеси отбирают аликвоту 75 мкл и наносят на кружок из фильтровальной бумаги Whatman 3ММ (диаметр

Таблица 9. Буферы, используемые для аффинной хроматографии

Буфер	Состав
Для гепарин-сефарозы	
Буфер А	50 мМ трис-HCl (рН 7,9) + 6 мМ $MgCl_2$ + 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид + 10 мМ меркаптоэтанол + 0,05%-ный (об./об.) монотиоглицерин + 20%-ный (об./об.) глицерин
Буфер Б	Буфер А + 75 мМ $(NH_4)_2SO_4$
Буфер В	Буфер А + 300 мМ $(NH_4)_2SO_4$
Буфер Г	Буфер А + 600 мМ $(NH_4)_2SO_4$
Для казеин-сефарозы	
Буфер Д	10 мМ трис-HCl (рН 7,5) + 10 мМ $MgCl_2$ + 22 мМ NH_4Cl + + 10 мМ меркаптоэтанол + 5%-ный глицерин
Буфер Е	Буфер Д + 100 мМ NaCl
Буфер Ж	Буфер Д + 200 мМ NaCl
Буфер З	Буфер Д + 600 мМ NaCl

2,5 см); фильтр немедленно промывают 5 раз 5%-ной (масс./об.) трихлороуксусной кислотой (по 50 мл на фильтр), а затем 5 мл 96%-ного (об./об.) этанола. Фильтры сушат и определяют радиоактивность на сцинтилляционном счетчике с толуолом в качестве растворителя.

Определение активности РНК-полимеразы. Доводят конечный объем до 0,1 мл; 100 мМ трис-HCl (рН 8,0), 1 мкМ дитиотреитол, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $MnCl_2$, 25 мкг денатурированной нагреванием ДНК из тимуса теленка, по 50 нмоль GTP, СТР и АТР и [^3H]UTP (130 пмколь, соответствующие 5 мкКи). Вводят в реакцию препарат РНК-полимеразы. После инкубации в течение 20 мин при 30 °С реакцию прекращают; отбирают аликвоты по 75 мкл и наносят на кружки из фильтровальной бумаги Whatman DE-81. Фильтры промывают 5 раз 5%-ной (масс./об.) холодной трихлороуксусной кислотой, содержащей 1% (масс./об.) пирофосфата натрия, и 1 раз смесью этанол — эфир (1 : 1); фильтры сушат и определяют радиоактивность на сцинтилляционном счетчике с толуолом в качестве растворителя.

Определение концентрации белка проводят по методике Брадфорда с кумасси голубым [46]; градуировочный график строят по бычьему сывороточному альбумину.

5.3. Оборудование и биоспецифические адсорбенты для аффинной хроматографии

1) Для проведения эксперимента необходимы две хроматографические колонки (1,6×20 см и 0,9×30 см), которые поставляются фирмой Pharmacia Fine Chemicals (марки К16/20 и К9/30), перистальтический насос (для подачи растворов на колонку) и коллектор фракций.

2) CNBr-активированная сефароза 4В выпускается фирмой Pharmacia Fine Chemicals; можно также провести активацию сефарозы по методике, предложенной в работе [47]; см. также в гл. 1, разд. 1.

3) Можно использовать гепарин-сефарозу, выпускаемую фирмой Pharmacia Fine Chemicals или же синтезированную путем присоединения гепарина к CNBr-активированной сефарозе 4В, как описано в работе [48].

4) Казеин-сефарозу 4В можно получить присоединением казеина к CNBr-активированной сефарозе 4В.

Методика [49]. Готовят суспензию казеина (500 мг) в 0,1 М $NaHCO_3$ (250 мл), содержащем 0,5 М NaCl. Поскольку казеин не растворяется в этом буфере, доводят pH до 13 путем добавления NaOH, а затем вновь до 8,0 путем добавления HCl. Добавляют полученный раствор казеина к CNBr-активированной сефарозе 4В (50 мг) и осторожно перемешивают в течение 18—20 ч при 4 °C. Суспензию промывают 0,1 М $NaHCO_3$, содержащим 0,5 М NaCl, и суспендируют в 1,0 М этаноламине (pH 8,0) при 2-часовом перемешивании. Дважды промывают 0,1 М ацетатным буфером (pH 4,0), содержащим 1,0 М NaCl, и в заключение 0,1 М боратным буфером (pH 8,0), содержащим 1,0 М NaCl. Перед упаковкой уравновешивают казеин-сефарозу буфером Д (табл. 9).

5.4. Методика хроматографии на гепарин-сефарозе

5.4.1. Колоночный метод.

1) В колонку (1,6×20 см) заливают при 4 °C суспензию 14 г влажной гепарин-сефарозы в буфере Б (~14 мл).

2) Дают гелю осесть на 3—4 см.

3) После выхода с колонки 12—13 мл буфера гель уравновешивают буфером Б (150 мл) при скорости потока 16—20 мл/ч, используя перистальтический насос.

4) Быстро доводят электропроводность раствора ферментов

до уровня буфера Б разбавлением буфером А до конечного объема 100—110 мл.

5) С помощью насоса вводят раствор ферментов на колонку и промывают колонку 250 мл буфера Б (лучше в течение ночи).

6) Затем промывают буфером В, собирая фракции между 15 и 25 мл, содержащие белковый пик.

7) Промывают колонку буфером В (~50 мл), пока содержание белка в элюате не станет <0,1 мг/мл. Промывают буфером Г и собирают белковый пик, который должен выходить между 13 и 28 мл.

Таблица 10. Данные по очистке РНК-полимеразы и протеинкиназы[а]

Стадия очистки	Гистонкиназа		Казеинкиназа		РНК-полимераза		Содержание белка, мг
	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	
Исходный гомогенат	50	—[б]	75	—[б]	1,5	—[б]	436
Осадок после обработки сульфатом аммония	88	100	135	100	5	100	326
Гепарин-агароза							
Несвязавшаяся фракция	102	77	51	18	0,7	9	216
Элюирование 300 мМ $(NH_4)_2SO_4$	65	15	1662	87	15	21	23
Элюирование 600 мМ $(NH_4)_2SO_4$	110	2	393	3	251	61	4
Казеин-агароза[в]:							
Несвязавшаяся фракция	Не определялась	Не определялся	110	4	21	17	16
Элюирование 600 мМ NaCl	»	»	38 100	57	0	0	0,7

[а] За единицу активности протеинкиназы принималось количество фермента, катализирующее перенос 1 пкмоля концевой группы [^{32}P]ATP на белковый субстрат за 1 мин при 37 °С. Одна единица активности РНК-полимеразы соответствовала включению 1 пкмоля UMP в РНК за 1 мин при 30 °С.

[б] Из-за присутствия нуклеаз и фосфатаз полная активность исходного гомогената по данному ферменту значительно ниже.

[в] Фракция, элюированная с гепарин-агарозы 300 мМ $(NH_4)_2SO_4$, была нанесена на колонку с казеин-агарозой.

По этой методике можно выделить:

а) гистонкиназу (элюирована в исключающемся объеме);

б) казеинкиназу и минорную фракцию РНК-полимеразы (элюируются буфером В);

в) основные количества РНК-полимеразы (~60% полной активности; элюируется буфером Г; см. табл. 10 и рис. 10).

Если вместо ступенчатого градиента используют линейный градиент соли, то РНК-полимераза вновь дает два пика на кривой элюирования, т. е. получение двух пиков фермента не вызы-

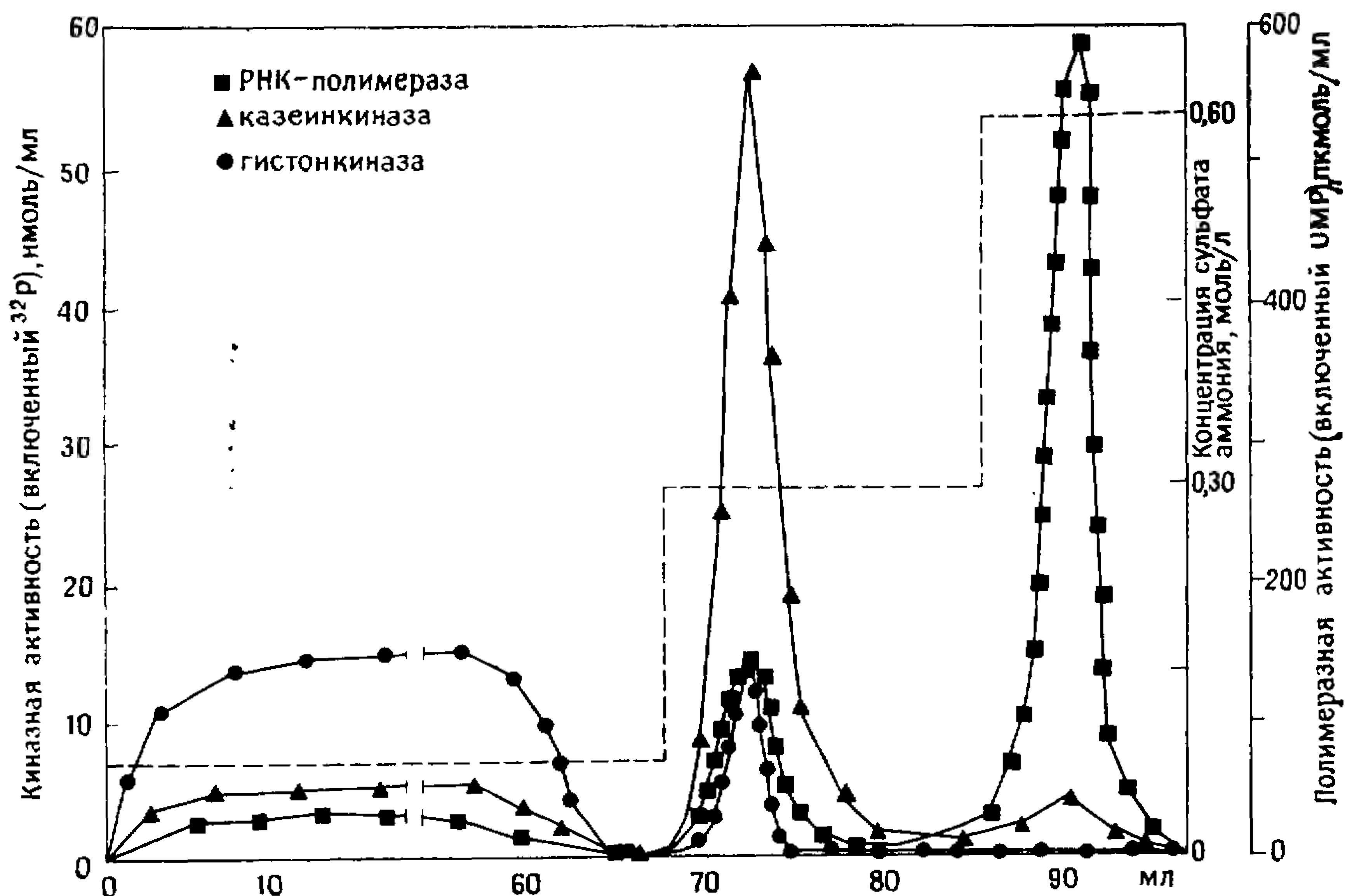


Рис. 10. Разделение РНК-полимеразы и протеинкиназ на колонке с гепарин-сефарозой.

вается перегрузкой колонки или неправильным выбором ступенчатого градиента.

5.4.2. Комбинация бетч- и колоночного методов для гепарин-сефарозы. Для ускорения наиболее продолжительных стадий процесса (связывание ферментов с гепарин-сефарозой и промывание колонки, стадии 1÷5) может быть применен бетч-метод, который следует также использовать при работе с бо́льшими количествами вещества.

1) Гепарин-сефарозу (20 г) уравновешивают буфером Б до достижения в элюате соответствующей электропроводности.

2) Быстро доводят электропроводность исходного раствора ферментов до уровня буфера Б путем разбавления буфером А.

3) Приливают раствор ферментов к уравновешенной гепарин-сефарозе и оставляют на 1 ч при осторожном перемешивании; суспензию центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин.

4) Супернатант отделяют, приливают к гелю буфер Б (70 мл) и осторожно перемешивают. Суспензию центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин и супернатант отбрасывают.

5) Гель промывают буфером Б (3 раза по 70 мл).

6) Гель суспендируют в ~15 мл буфера Б, суспензию выливают в колонку (1,6×20 см) и дают гелю осесть на ~5 см.

7) После прохождения через колонку 15 мл буферного раствора на колонку с помощью перистальтического насоса подают буфер Б со скоростью потока 16—20 мл/ч.

8) Собирают фракцию элюата между 13 и 23 мл, соответствующую белковому пику.

9) Применение бетч-процесса уменьшает продолжительность лабораторной работы с двух дней до одного и обеспечивает разделение ферментов, как и колоночный метод. Однако выход и степень очистки оказываются на ~30% ниже, чем при использовании колоночного метода.

5.5. Методика хроматографии на казеин-сефарозе

Фракция, элюированная с гепарин-сефарозы буфером В, содержит основную казеинкиназную активность и некоторое количество РНК-полимеразной активности (рис. 10). Для разделения и дальнейшей очистки этих ферментов может быть использована хроматография на казеин-сефарозе. Наиболее существенно удалить избыток соли из указанной фракции (содержащей 300 мМ $(NH_4)_2SO_4$), что можно осуществить диализом в течение ночи в буфере Д (3 раза по 500 мл).

1) После диализа образец центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 об/мин и осадок отбрасывают.

2) Колонку (0,9×30 см) при 4 °С заполняют влажной агарозой (10 г); дают гелю осесть на ~3 см.

3) После прохождения через колонку 8 мл буферного раствора на колонку с помощью перистальтического насоса подают 100 мл буфера Д со скоростью потока 16—20 мл/ч.

4) На колонку наносят раствор ферментов (после диализа) и собирают первый объем, прошедший через колонку.

5) Колонки промывают буфером Е (20 мл), буфером Ж (20 мл), затем буфером З и собирают элюат между 16 и 35 мл буфера З.

При хроматографии в описанных выше условиях РНК-полимераза не связывается аффинным сорбентом и не удерживается на колонке, а элюируется в исключающемся объеме, в то время как прочно связанная казеинкиназа десорбируется с колонки

только буфером 3 с высокой ионной силой (рис. 11). В результате хроматографии достигается разделение киназной и полимеразной активностей со значительной очисткой казеинкиназы и значительным повышением ее удельной активности (табл. 10).

Замечание. Упаковку и уравновешивание колонки следует проводить за день до проведения стадии разделения.

5.6. Характеристика РНК-полимеразных фракций, выделенных с колонки с гепарин-сефарозой

Первая фракция РНК-полимеразы элюируется с колонки буфером В, содержащим 300 мМ $(NH_4)_2SO_4$, а вторая — буфером Г, содержащим 600 мМ $(NH_4)_2SO_4$. Основные критерии классификации РНК-полимеразы заключаются в чувствительности к α-аманитину и в порядке элюирования с ионообменников [50]. Первая фракция РНК-полимеразы устойчива к α-аманитину при концентрациях до 400 мкг/мл, в то время как вторая фракция ингибируется на 60% при концентрации 0,1 мкг/мл. Co-

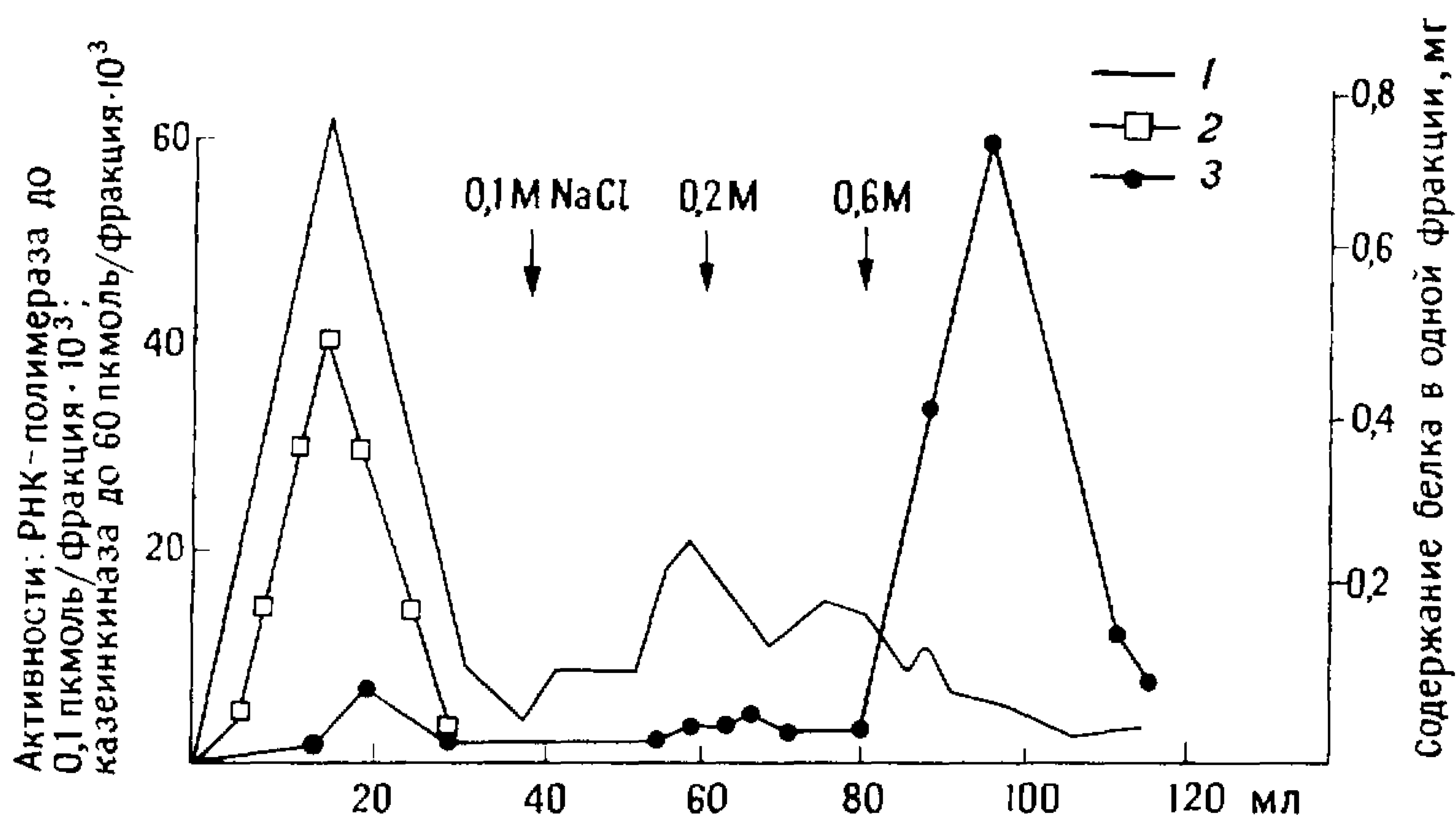


Рис. 11. Разделение РНК-полимеразы I и казеинкиназы на колонке с казеин-сефарозой 4B. *1* — концентрация белка; *2* — РНК-полимераза; *3* — казеинкиназа.

гласно опубликованным данным [50, 51], первая фракция, по-видимому, соответствует РНК-полимеразе I, а вторая фракция — РНК-полимеразе II. Это подтверждается порядком элюирования с ДЭАЭ-сефадекса линейным градиентом соли. Соотношение активностей, элюированных при 300 мМ и 600 мМ концентрациях сульфата аммония, также свидетельствует о том, что эти фракции представляют собой нуклеолярную РНК-полимеразу I и нуклеоплазматическую полимеразу II соответственно.

5.7. Концентрирование и хранение ферментных препаратов

При работе по описанным выше методикам должно соблюдаться соотношение аффинного адсорбента к наносимому белку; например, для белковых экстрактов, полученных из 20 г проростков кукурузы, надо брать оптимально 14 г гепарин-сефарозы. При использовании меньших количеств белка фермент элюируется в слишком разбавленном виде, а при нанесении большего количества белкового экстракта увеличивается продолжительность стадий разделения и имеет место частичная инактивация фермента. При работе в рекомендованных условиях последующее концентрирование фермента не обязательно. Получаемый при этом раствор фермента устойчив и может храниться несколько недель (при —70 °С) без потери активности; в этом виде раствор фермента непосредственно можно вводить в следующий этап очистки.

При необходимости для концентрирования казеинкиназы можно использовать фильтрационную камеру Amicon с мембраной UM10; полученные препараты надо хранить в виде небольших порций, соответствующих содержанию белка 0,5÷1,0 мг/мл, при охлаждении в жидком азоте.

5.8. Регенерация и хранение аффинных адсорбентов

Указанные выше аффинные матрицы могут использоваться несколько раз без заметной потери связывающей емкости, при этом прочно удерживаемые примеси можно удалить путем промывания колонки по следующей схеме:

1) 2,0 М сульфат аммония (2 объема);

2) 1,0 М трис(рН 8), содержащий 6,0 М мочевину (3 объема);

3) дистиллированная вода (5 объемов).

Аффинные матрицы хранят при 4 °С в уравновешивающем буфере, содержащем азид натрия (0,02% масс./об.).

5.9. Замечания по экспериментальным методикам

Все стадии экстракции ферментов, очистки и концентрирования должны проводиться при 2—4 °С. Ввиду нестабильности восстанавливающих агентов, монотиоглицерина и меркаптоэтанола, их следует добавлять в буферы непосредственно перед использованием. CNBr-активированная сефароза 4B неустойчива и должна немедленно вводиться в реакцию конденсации с лигандами. α-Аманитин — чрезвычайно токсичное соединение и при работе с ним должны быть приняты специальные меры предосторожности. Особое внимание следует обратить на соблюдение

рекомендованных значений ионной силы растворов препаратов, наносимых на аффинные колонки, поскольку этот фактор критический для разделения и очистки ферментов.

6. ПРИСОЕДИНЕНИЕ *м*-АМИНОФЕНИЛБОРНОЙ КИСЛОТЫ К ТРИАЗИНАКТИВИРОВАННЫМ НОСИТЕЛЯМ

С целью нахождения оптимальных условий реакции присоединения *м*-аминофенилборной кислоты (АФБК) к триазинактивированным агарозным шарикам изучено применение четырех различных буферов [55]. Приведем описание используемой методики.

Влажный активированный гель (2 г) суспендируют в буфере (2 мл) и добавляют к суспензии буфер (4 мл), содержащий 0,1 М АФБК. Суспензию перемешивают при комнатной темпе-

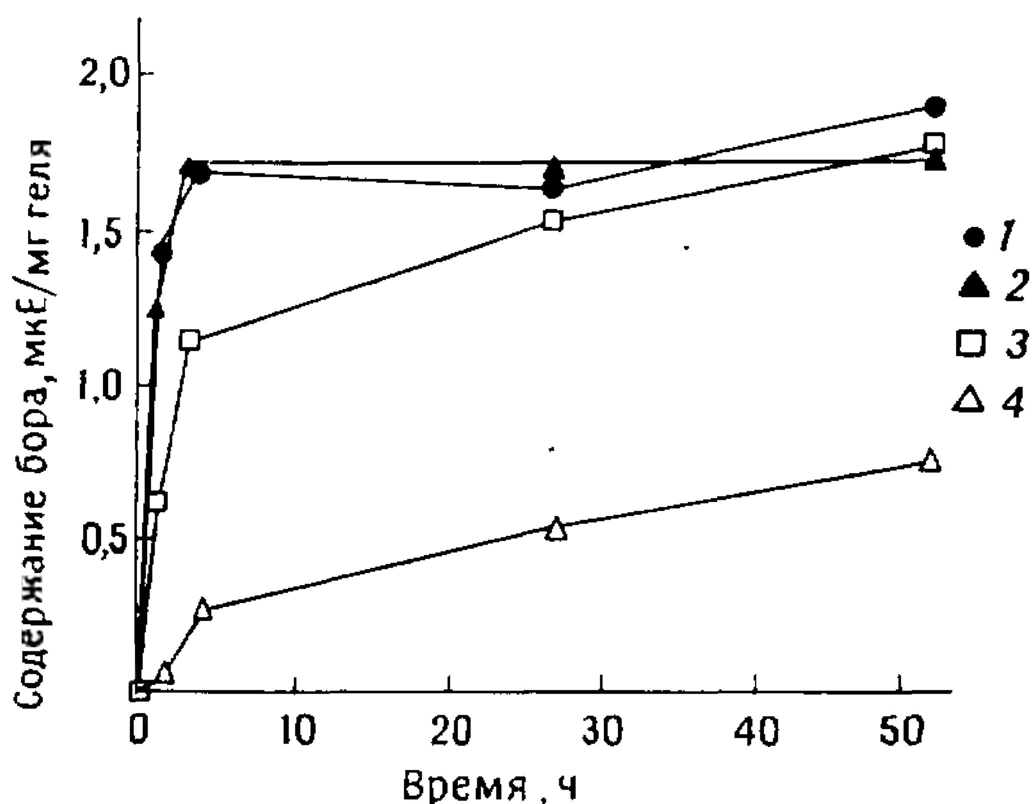


Рис. 12. Изменение во времени степени присоединения *м*-аминофенилборной кислоты к триазинактивированному гелю матрекс. Растворы для присоединения: *1* — 10 мМ NaOH; *2* — 0,5 М калийфосфат (pH 7,5); *3* — 0,5 М трис-HCl (pH 8,8); *4* — 0,5 М натрийбикарбонат — карбонат (pH 10,25).

ратуре на смесителе Коултера, отбирают через определенные промежутки времени аликвоты, которые промывают и анализируют на содержание бора. Результаты представлены на рис. 12. При осуществлении реакций присоединения аминосодержащих лигандов к различным типам активированных носителей для обеспечения нуклеофильной атаки аминогруппы в незаряженной форме на активированную матрицу во многих работах рекомендуется использовать буферы с высоким pH. Однако, поскольку pK_a ароматических первичных аминогрупп гораздо ниже, чем у

алифатических аминогрупп, присоединение АФБК к триазинактивированным гелям можно проводить в более мягких условиях. Результаты, приведенные на рис. 12, свидетельствуют о том, что присоединение протекает быстро при высоком pH (10 мМ NaOH), но в равной степени быстро и при более низких pH (фосфат калия, pH 7,5). Интересна также медленная реакция, наблюдаемая в бикарбонатном буфере (pH 10,25), поскольку многие исследователи рекомендуют использовать бикарбонатные буферы для иммобилизации различных лигандов к активированным гелям разных типов. Широкое распространение получило представление о том, что специфические условия присоединения, пригодные для одного конкретного случая, будут столь же хороши для других. Однако приводимые здесь результаты свидетельствуют совсем о другом.

Присоединение в трис-HCl (pH 8,3) протекает со средней скоростью, но в итоге гель содержит столько же бора, сколько и в случае проведения конденсации в NaOH или фосфатном буфере. Следовательно, сам трис не реагирует с активированным гелем. Это может быть, кроме того, продемонстрировано отсутствием реакции после 18-часовой инкубации активированного геля в 2,0 М трисе при pH 10,0 и 60 °С. На геле до и после обработки иммобилизуются равные количества алифатического диамина, и общее содержание азота в геле не меняется после инкубации. Было обнаружено, что родственное соединение, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол, также не реагирует с триазинактивированными гелями. Структурные модели этих двух соединений указывают на то, что в наиболее стабильной форме атом азота стерически экранируется гидроксиметильными группами, которые могут сильно уменьшать его нуклеофильность. Для демонстрации этого факта можно показать, что ни один из этих двух аминов не реагирует с нингидрином с образованием синего продукта. По этим причинам вполне вероятно, что трис в равной степени не будет реагировать и с другими активированными матрицами различных типов и, таким образом, без всяких проблем может быть использован в буферах для присоединения лигандов. В действительности широко распространено мнение о нежелательности использования триса в растворах для присоединения лигандов, и очень часто трис рекомендуется в качестве удобного реагента для блокирования остающихся после иммобилизации лиганда активных групп.

Было обнаружено, что для присоединения АФБК к другим носителям, например триазинактивированной бумаге, эпоксиактивированной сефарозе 6В (Pharmacia) и эупергиту С (Rohm Pharma), удовлетворительные результаты дает 0,5 М калийфосфатный буфер (pH 7,8), содержащий 0,1 моль/л АФБК. Оставшиеся активные группы могут быть блокированы этаноламином (1,0 М).

6.1. Хроматография с использованием иммобилизованной АФБК

1) *Нуклеозиды.* Используют колонки объемом 1,5 мл (3,9×
×0,7 см) или 2 мл (5,2×0,7 см), скорость потока 2 мл/ч, собирают фракции по 1 или 2 мл. Предварительно колонку уравновешивают буфером (50 мМ фосфат калия, содержащий 1,0 моль/л NaCl, pH 7,8) в течение ~24 ч. На колонку наносят смесь нуклеозидов и дезоксинуклеозидов (по 2,5 мкмоль) в уравновешивающем буфере (общий объем раствора 0,4 мл). После того как раствор образца войдет в гель (чуть ниже поверхности геля), остатки этого раствора смывают, добавляя в колонку дополнительно небольшой объем буфера (0,4 мл). Колонку промывают уравновешивающим буфером. Дезоксинуклеозиды собирают в исключающемся объеме, а прочно удерживаемые (сильно связанные) нуклеозиды десорбируют тем же буфером, содержащим 100 ммоль/л сорбита. Работу на колонках проводят при 4 °С или при комнатной температуре. Кривые элюирования записываются на основании данных по поглощению при 260 нм.

2) *Гликопротеины.* На колонку (объем 2 мл) с АФБК-матрекс-гелем наносят белок (2—4 мг), растворенный в ~250 мкл буфера (50 мМ таурин/NaOH, pH 8,7, содержащий 20 ммоль/л $MgCl_2$); может возникнуть необходимость использования градиента концентрации $MgCl_2$ в интервале 0÷50 ммоль/л. При скорости потока 2 мл/ч собирают фракции по 2 мл. Элюирование связавшегося белка достигается уравновешивающим буфером, содержащим 50 ммоль/л сорбита или 50 ммоль/л трис-HCl.

Колонки можно регенерировать путем промывания 50 мМ NaOH или 200 мМ натрийацетатным буфером (pH 5,4).

7. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

7.1. Получение матриц с иммобилизованными красителями

7.1.1. Метод Хейнса и де Мура [53].

1) Агарозные шарики (5 г влажного носителя) переносят на воронку с пористым стеклянным фильтром и промывают (с отсасыванием) дистиллированной водой для удаления азидного консерванта.

2) Осторожно продолжают отсасывание до появления трещин на поверхности геля.

3) К полученной агарозе добавляют раствор соответствующего красителя (80 мг в 2,5 мл дистиллированной воды) и перемешивают на смесителе Коултера.

4) После добавления раствора Na_2CO_3 (168 мг в 2,5 мл дистиллированной воды) и тщательного перемешивания суспензию инкубируют в течение 40 ч при 45 °С с периодическим перемешиванием.

5) Выливают окрашенный гель на воронку с пористым стеклянным фильтром и промывают дистиллированной водой до отсутствия свободного красителя в элюате.

6) Гель промывают 1,0 *М* KCl и 4,0 *М* мочевиной для удаления оставшегося красителя и затем тщательно промывают дистиллированной водой.

7.1.2. Метод Дина и Уотсона [*54*]. Некоторые матрицы с иммобилизованным красителем могут быть получены более эффективно по методике «с включением соли», согласно которой для ускорения реакции и уменьшения гидролиза триазинового компонента в инкубационную смесь добавляют хлорид натрия [58].

1) К агарозным шарикам (10 г влажного носителя) в дистиллированной воде (25 мл) добавляют раствор красителя (250 мг в 25 мл дистиллированной воды), смесь перемешивают на смесителе Коултера в течение 5 мин.

2) Добавляют 20%-ный (масс./об.) раствор NaCl и перемешивают еще 30 мин.

3) Затем добавляют 1,0 *М* Na_2CO_3 (12,5 мл), смесь тщательно перемешивают и инкубируют в течение 40 ч при 45 °С с осторожным перемешиванием.

4) После присоединения отмывают окрашенный гель от несвязавшегося красителя, как описано выше.

Матрицы с иммобилизованными красителями с различными концентрациями лиганда могут быть получены путем изменения количества красителя, добавляемого к гелю в реакции присоединения.

7.1.3. Хранение и регенерация матриц с иммобилизованными красителями. Матрицы с красителями, не находящиеся в работе, следует хранить во влажном виде при 4 °С в 0,1%-ном (масс./об.) растворе азида натрия. После использования матрицы с красителями можно регенерировать путем промывания 4,0 *М* мочевиной в 0,5 *М* NaOH (три объема колонки) для удаления связавшегося материала с последующим уравновешиванием колонки соответствующим буфером (15—20 объемов колонки).

7.1.4. Выбор аффинного сорбента с иммобилизованным красителем. Эксперимент проводится при 4 °С.

1) Матрицы с иммобилизованными красителями упаковывают в поликарбонатные колонки (2,3×0,7 см).

2) Колонки промывают уравновешивающим буфером (10—15 объемов колонки) и затем на каждую наносят образец, предварительно диализованный против уравновешивающего буфера.

3) Промывают колонки уравновешивающим буфером до выхода с колонок по 5 мл элюата.

а) При исследовании возможности биоспецифического элюирования готовят раствор соответствующего элюирующего вещества в уравновешивающем буфере (1 мл), доводят pH до требуемого значения и наносят этот раствор на колонку. Колонку промывают уравновешивающим буфером до выхода 5 мл элюата.

б) В случае метода неспецифического элюирования колонку промывают уравновешивающим буфером, содержащим 1,0 моль/л KCl.

Предложен [55] поперечно-сшитый бисакриламидный гель, к которому через полиакриламидные цепочки различной длины ковалентно присоединены красители, специфичные к основаниям нуклеотидов.

На основе специфичности к парам азотистых оснований иммобилизованные (AT)-специфичный малахитовый зеленый и (GC)-специфичный фениловый красный нейтральный используются при фракционировании ДНК из бактерий или млекопитающих, а также могут быть применены для разделения определенных фрагментов фаговой ДНК.

Гели с иммобилизованными акридином желтым ED или фениловым красным нейтральным проявляют специфичность к структуре и могут быть использованы для специфичных разделений суперспиральной ДНК от других нативных форм ДНК — открытой кольцевой или линейной [56].

7.2. Хроматография ДНК на бисакриламидах с иммобилизованными красителями. Общая методика

7.2.1. Предварительная обработка геля и упаковка хроматографической колонки.

1) Гель (20 г) суспендируют в ~10 объемах 10 мМ натрийфосфатного буфера, содержащего 1 ммоль/л ЭДТА (pH 6,0).

2) После осаждения геля слегка мутный супернатант декантируют и материал вновь суспендируют в том же буфере.

3) После повторения этой операции по крайней мере 3 раза гель переносят в хроматографическую колонку подходящего размера (1,2×22 см, ~25 мл) и промывают 2,0 М перхлоратом натрия в 10 мМ натрийфосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 1 ммоль/л ЭДТА.

4) Через колонку пропускают два (колоночных) объема 10 мМ натрийфосфатного буфера (pH 6,0), содержащего 1 ммоль/л ЭДТА. При промывании 2,0 М перхлоратом удаляются мелкие частицы геля, содержащего краситель (которые ухудшают скорость потока через колонку).

7.2.2. Аффинная хроматография.

1) Наносимая на колонку ДНК должна быть предварительно очищена от белковых примесей.

2) ДНК растворяют в 10 мМ натрийфосфатном буфере, содержащем 1 ммоль/л ЭДТА (pH 6,0); концентрация раствора 50—100 мкг ДНК/мл (что соответствует $A_{260}=1\div2$). Раствор наносят на колонку. Максимальная емкость гелей составляет ~40 мкг ДНК/мл упакованного геля ($A_{260}=0{,}8$).

3) После промывания колонки несколько раз тем же буфером элюируют ДНК линейным градиентом перхлората натрия ($0\div2{,}0$ моль/л) в 10 мМ натрийфосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 1 ммоль/л ЭДТА. Оптимальная скорость потока составляет 10—15 мл/ч; собирают фракции по 5—8 мл.

В некоторых случаях при элюировании суперспиральной ДНК с гелей, специфичных к структуре, может возникнуть необходимость увеличения концентрации перхлората до 5,0 моль/л (также в натрийфосфатном буфере, pH 6,0, содержащем ЭДТА).

7.2.3. Регенерация и хранение. Колонки с аффинными адсорбентами могут быть регенерированы и без ограничений использованы повторно. Для регенерации гели промывают (по крайней мере 2 объемами колонки) 5,0 М перхлоратом натрия в 10 мМ натрийфосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 1 ммоль/л ЭДТА, и затем (несколькими объемами колонки) 10 мМ натрийфосфатного буфера, содержащего 1 ммоль/л ЭДТА (pH 6.0). Хранят колонки в темноте при комнатной температуре.

Внимание! Следует обратить внимание, что регенерация геля с малахитовым зеленым осуществляется при pH 6,0 или ниже. При pH>6,0 основание малахитового зеленого будет превращаться в бесцветное карбинольное основание, которое не проявляет сродства и специфичности к ДНК [57].

Гели аффинных адсорбентов, особенно содержащие фениловый красный нейтральный, чрезвычайно чувствительны к свету. Поэтому следует позаботиться о том, чтобы не подвергать колонки действию света, даже в процессе хроматографии, например обернуть колонки алюминиевой фольгой.

7.2.4. Применение. (АТ)-специфичный гель с малахитовым зеленым и (GC)-специфичный гель с фениловым красным нейтральным могут быть использованы для аффинной хроматографии двуспиральной ДНК, основанной на специфичности к парам азотистых оснований. Для специфичного к основаниям разделения ДНК выбирают гель, с которого желаемая фракция ДНК элюируется первой, т. е. для выделения (АТ)-обогащенной сателлитной ДНК используется гель с фениловым красным нейтральным, а для выделения (GC)-обогащенной ДНК из тимуса теленка — гель с малахитовым зеленым (АТ-специфичный).

Так, гель с иммобилизованным малахитовым зеленым был успешно применен для разделения сателлитной и хромосомной

ДНК из *Halobacterium halobium* [59] и для разделения триплексов поли(dA)·(dT)·(rU) и поли(dA)·2(rU) [63], гель с фениловым красным нейтральным был использован для получения фракционированной по размеру ДНК нематоды [60] для экспериментов по клонированию.

Разрешающая способность этого метода аффинной хроматографии для нуклеиновых кислот в большинстве случаев превосходит результаты фракционирования ДНК в градиенте плотности в присутствии лигандов, специфичных к парам оснований.

Гели с акридиновым желтым или фениловым красным нейтральным удобны для структурно-специфического разделения суперспиральной ДНК от открытой кольцевой или линейной ДНК, поскольку эти красители образуют комплексы включения с энергетически выгодной суперспиральной ДНК [56, 62].

Описан [61] быстрый метод получения ДНК из *Escherichia coli*, содержащей плазмиду pBR322, с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованном красителе акридиновом желтом.

8. ИММОБИЛИЗАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ

8.1. Получение N⁶-(6-аминогексил)-5′-AMP [64]

1) В стеклянную ампулу (155×15 мм) помещают водный раствор (0,6 мл) натриевой соли 5′-монофосфата рибозида 6-меркаптопурина (**I**, рис. 13) (10 мг, 0,024 ммоля) и 1,6-гександиамина (**II**, $n=6$) (200 мг, 1,75 ммоля).

2) Запаянную ампулу нагревают в течение ночи (~16 ч) при 85—95 °С; ампула находится в алюминиевом блоке в горизонтальном положении; полнота реакции зависит от отношения поверхности к объему лиганда.

3) Для контроля хода реакции можно использовать спектральный анализ при удобном разбавлении в воде. При протека-

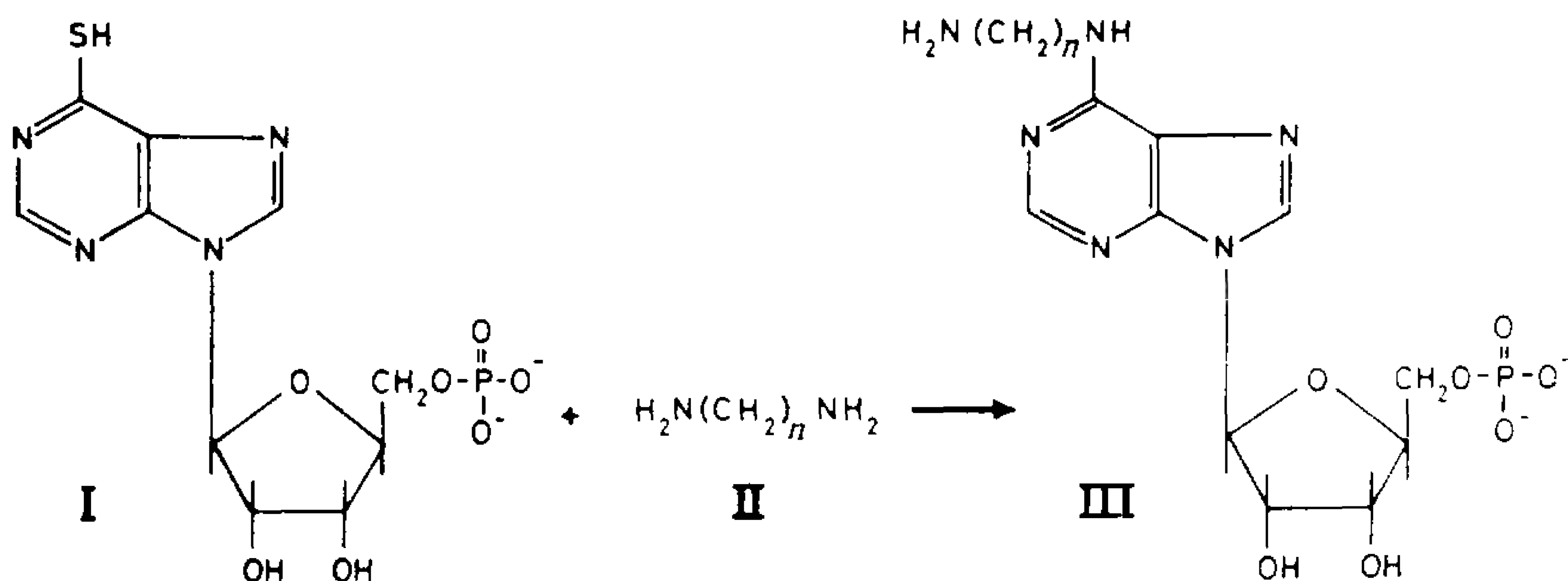


Рис. 13. Реакция получения N⁶-(6-аминогексил)-5′-AMP.

нии реакции поглощение при 309 нм уменьшается, а при 267 нм увеличивается (рис. 14), что отражает изменение максимума поглощения при щелочных pH при превращении 6-меркаптопурина в N^6-алкилзамещенный аминопурин. На завершение реакции указывает отсутствие поглощения при 309 нм. Обычно реакция количественно протекает за 16 ч, хотя в некоторых случаях может происходить и дольше.

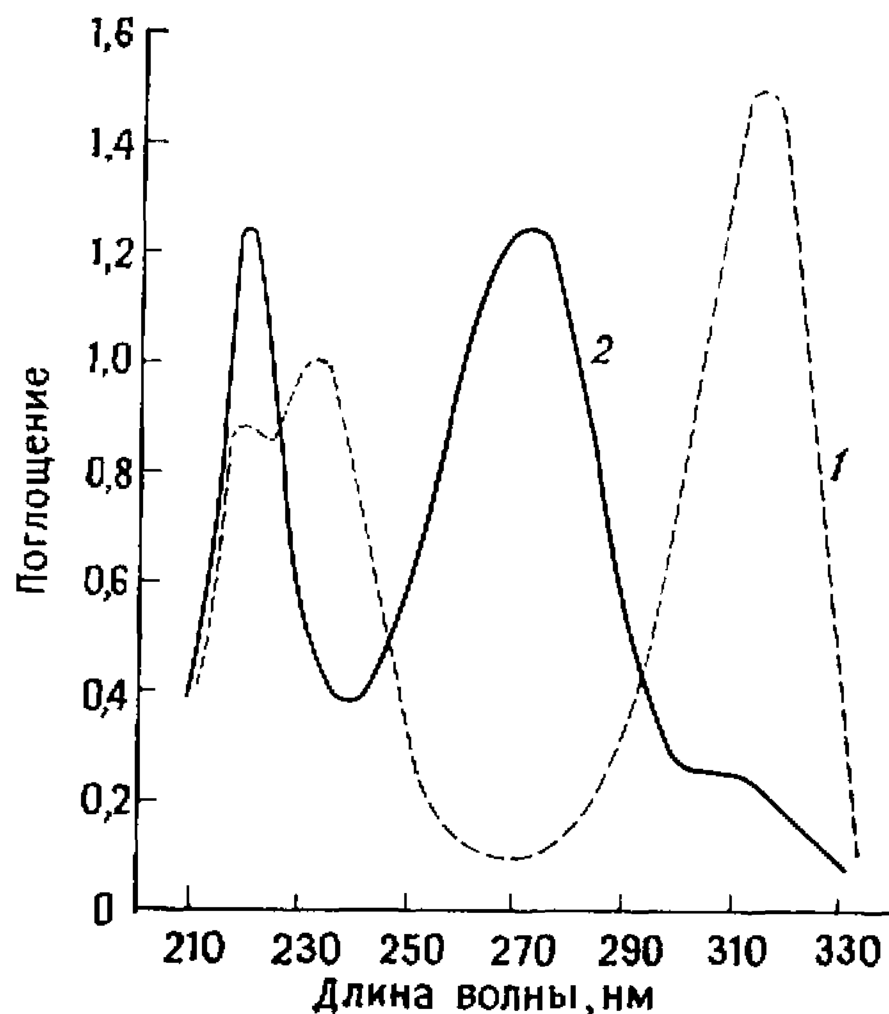


Рис. 14. Спектры поглощения при pH 12 5′-фосфата рибозида 6-меркаптопурина (10 мг) и гександиамина (200 мг) в воде (0,6 мл). *1* — сразу после растворения; *2* — через 16 ч при 85—95 °С [64].

4) По охлаждении реакционную смесь разбавляют водой (10 мл) и лиофилизуют до получения светло-желтого гигроскопичного остатка.

5) Эту операцию повторяют несколько раз для удаления избытка гександиамина.

6) Полученный светло-желтый остаток растворяют в минимальном объеме воды и наносят при pH 10,0 на колонку (5×50 мм) со смолой дауэкс 1-Х2 (формиатная форма; 200—400 меш) при комнатной температуре.

7) Колонку промывают 0,1 *М* формиатом аммония (pH 7,0) для удаления примесей и затем элюируют нуклеотид линейным градиентом формиата аммония (pH 5,5; 0,1÷1,0 моль/л, суммарный объем элюента 50 мл).

8) Собирают фракции по 1 мл; фракции, поглощающие при 267 нм, объединяют.

9) После лиофилизации остатки формиата аммония удаляют

путем вакуумной возгонки над смесью NaOH и безводного $CaCl_2$ (3 : 1 масс./масс.); выдерживают в этих условиях до постоянной массы.

8.2. Присоединение N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР к сефарозе 4В

1) 10 г (влажной) сефарозы 4В активируют бромоцианом.

2) Гель промывают ледяным 0,1 М $NaHCO_3$-буфером (pH 10,0) и добавляют к раствору N^6-(6-аминогексил)-5′-АМР (10 мг) в 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 10,0; 5 мл).

3) Суспензию перемешивают в течение ночи на смесителе Коултера при 4 °С.

4) Матрицу тщательно промывают водой, 1 М KCl и вновь водой; хранят в присутствии азида натрия (0,02%-ный масс./об.).

9. ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Гидрофобная хроматография открывает общий систематический путь для очистки как водорастворимых, так и липофильных белков. Метод основан на наличии гидрофобных участков

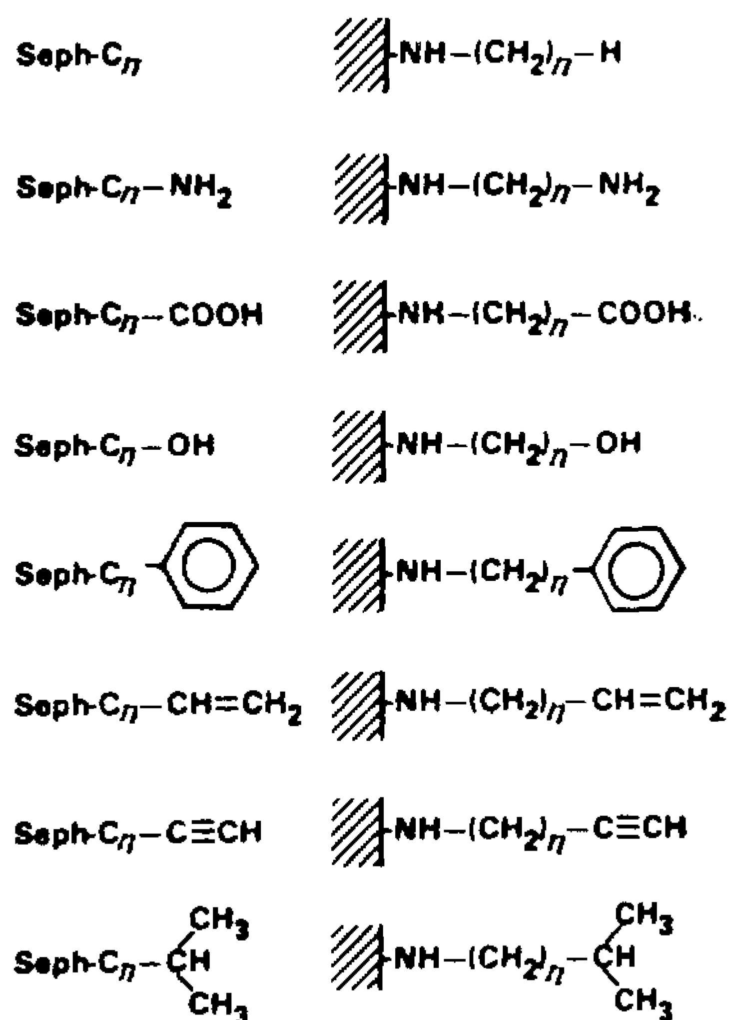


Рис. 15. Различные гомологические ряды производных алкил-агарозы (Seph-C_n-X), которые могут использоваться в гидрофобной хроматографии. Дополнительные ряды могут быть образованы при применении других функциональных групп, введении функциональной группы в различные положения углеводородной цепи или получении цепи, содержащей несколько функциональных групп [65].

на поверхности белков, что приводит к гидрофобным взаимодействиям различной силы с незаряженной матрицей, содержащей гидрофобные группы.

В подходе, описанном ниже, используются гомологические ряды алкил-агароз и их производных (рис. 15) для достижения разделения и очистки белков и клеток [65].

9.1. Синтез сефарозы-C_n (n=1÷12) CNBr-методом

1) Сефарозу 4В активируют реакцией с CNBr при pH 10,5÷÷11,0 и 22 °С.

2) CNBr (1 г в 1 мл диоксана) добавляют к агарозе (10 г влажного носителя), суспендированной в воде (20 мл).

3) Активацию начинают после доведения pH смеси до 11,0 путем добавления 5,0 М NaOH.

4) Проводят реакцию в течение 5 мин при осторожном перемешивании, поддерживая pH 10,5÷11,0 с помощью 5,0 М NaOH.

5) Для прекращения активации добавляют измельченный лед; смесь фильтруют и гель промывают ледяной водой (100 мл).

6) Растворяют соответствующий *н*-алкиламин (4 моль/моль CNBr, использованного для активации агарозы) в растворителе, состоящем из равных объемов N,N′-диметилформамида и 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 9,5) (20 мл), и при необходимости доводят pH до 9,5. В случае алкиламинов с длинной углеводородной цепью (n>8) может образоваться гель или осадок; смесь следует нагреть до ~60 °С до получения прозрачного раствора, быстро охладить и смешать с активированной агарозой до повторного появления осадка.

7) Реакцию проводят при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 10 ч с осторожным перемешиванием.

8) Алкил-агарозу отфильтровывают и последовательно промывают (по пять объемов каждого) дистиллированной водой, 0,2 М уксусной кислотой, дистиллированной водой, 20 мМ NaOH, водой, водно-диоксановой смесью (1 : 1 об./об.), 50 мМ уксусной кислотой и в заключение ~20 объемами дистиллированной воды.

9) Перед использованием каждую колонку промывают и уравновешивают буфером, выбранным для хроматографии.

Другая методика [66]

1) Проводят стадию присоединения в смеси диоксан — вода (95 : 5, об./об.) в течение 20 ч при pH 9,0 и 22 °С.

2) Тщательно промывают адсорбент 2÷3 объемами каждой из следующих смесей диоксан — вода (об./об.): 95 : 5; 80 : 20; 60 : 40; 40 : 60 и 20 : 80.

3) Переносят полученный гель в 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 9,5), встряхивают 1 ч при комнатной температуре, затем промывают ~20 объемами воды и суспендируют в выбранном буфере.

Для синтеза ряда идентичных адсорбентов, отличающихся только длиной алкильной боковой цепи, надо работать по одной методике. В систематических исследованиях, преследующих цель разработки условий методики очистки, существенно определение плотности лиганда и заряда на адсорбентах по методикам, описанным ниже.

9.2. Синтез аминоалкил-сефарозы-C_n-NH_2 ($n=2\div12$) CNBr-методом

Сефарозу-C_n-NH_2 получают CNBr-активацией сефарозы 4В с последующей реакцией с α,ω-диаминоалканами, содержащими n углеродных атомов в цепи. Методика получения этих гомологических рядов описана выше для рядов алкил-сефарозы-C_n.

9.3. Свойства и характеристика адсорбентов

9.3.1. Определение массы сухого вещества. Гель промывают 20 объемами деионизованной воды, берут три навески по 1 г влажного носителя и сушат их в вакууме при 120 °С до постоянной массы. Среднюю массу этих трех проб принимают за массу сухого вещества этого конкретного адсорбента.

9.3.2. Определение плотности лиганда на колонках с помощью радиоактивно меченных лигандов.

1) Навески адсорбентов (0,3 г влажного вещества) растворяют в 1 мл 6,0 М HCl и добавляют 10 мл толуольного раствора тритона.

2) Смесь встряхивают до образования прозрачного раствора и определяют радиоактивность на сцинтилляционном счетчике [состав жидкого сцинтиллятора: 1,4-бис-[2-(5-фенилоксазолил)]бензол (0,1 г) + 2,5-дифенилоксазол (8 г) + толуол (666 мл) + тритон X-100 (333 мл)].

3) Определяют эффективность подсчета радиоактивности, определяя радиоактивность шести идентичных навесок радиоактивно меченного свободного лиганда (например, *н*-1-[^{14}C]додецилового спирта), три из которых не содержат добавок, а три другие содержат по 0,3 г (влажное вещество) соответствующего нерадиоактивного адсорбента, растворенного в 1 мл 6,0 М HCl, как описано выше.

4) Используют экспериментально установленную эффективность подсчета радиоактивности для корректировки значений, полученных при определении плотности лиганда.

9.4. Выбор колонки (аффинного сорбента) для очистки конкретной системы

Выбор подходящей замещенной агарозы из данного гомологического ряда, например в ряду алкил-сефароз, проводится на группе адсорбентов, предназначенных для разделения данной системы. «Набор» колонок представляет собой несколько пастеровских пипеток (0,5×5 см), каждая из которых упакована определенным членом гомологического ряда сорбентов, например сефарозой-C_n, где $n=1\div10$. Помимо этого, в набор колонок

включается две контрольные колонки: одна с немодифицированной агарозой Seph-C_0 и другая с агарозой Seph-C_{0N}, активированной CNBr и далее обработанной аммиаком с целью частичного моделирования функциональных групп, вводимых после CNBr-активации агарозы и последующего присоединения амина. Подобный набор адсорбентов можно получить для любых других рядов типа Seph-C_n-X.

Когда аликвоты белковой смеси (например, экстракта мышц) наносятся на каждую колонку из подготовленного набора, некоторые белки адсорбируются, а некоторые не связываются. С помощью электрофореза в градиенте полиакриламидного геля смеси несвязавшихся белков с каждой колонки можно показать [65], что увеличение длины углеводородной цепи адсорбента приводит к связыванию большего количества белков на колонке.

9.5. Оптимизация разделения двух ферментов

Для разделения двух ферментов необходимо получить характерные профили адсорбции для каждого, контролируя их концентрацию в несвязавшихся фракциях. Если два фермента различаются по их адсорбционным профилям, то, как правило, имеется возможность выбрать колонку, которая удерживает один фермент и не связывает другой. Например, при хроматографии экстракта мышц кролика на колонке с Seph-C_n-NH_2 с короткими цепями ($n=2$ или 3) не связывается гликогенсинтетаза I, которая связывается на Seph-C_4-NH_2 и может быть элюирована с нее линейным градиентом NaCl. Колонка с Seph-C_4-NH_2 удерживает синтетазу I, но не связывает гликогенфосфорилазу *b*, для которой в этой серии колонок аффинных сорбентов для связывания в идентичных условиях необходимо наличие углеводородных цепей с пятью или шестью атомами углерода. Следовательно, можно отделить гликогенсинтетазу, пропуская мышечный экстракт через Seph-C_4-NH_2, а затем выделить фосфорилазу *b* хроматографией несвязавшихся белков на Seph-C_6-NH_2; этот подход лежит в основе принципа последовательного фракционирования, описание которого приведено ниже для препаративных количеств [67].

70 мл мышечного экстракта кролика, содержащего 1,75 г белка с синтетазной активностью 0,2 Е/мг белка, наносят на колонку с Seph-C_4-NH_2 (2,4×10 см), уравновешенную буфером состава: 50 мМ β-глицерофосфат натрия+50 мМ 2-меркаптоэтанол+1 мМ ЭДТА (pH 7,0). После удаления несвязавшихся белков промыванием уравновешивающим буфером применяют линейный градиент NaCl в том же буфере. Гликогенсинтетаза I была очищена этим способом в одну стадию в 20—50 раз. Сильное отличие в поведении этого фермента и гемоглобина на

Seph-C_4-NH_2 дало возможность выделения гликогенсинтетазы из эритроцитов человека со степенью очистки 600 раз в одну стадию.

9.6. Выбор гомологического ряда аффинных сорбентов

Пробные наборы колонок очень удобны не только для решения вопроса о том, какая колонка в ряду может дать оптимальную очистку, но также и вообще для выбора наиболее подходящего ряда адсорбентов. Исследованиями такого рода удалось найти тактику разделения клострипаина и коллагеназы [68]. Оба фермента имеют очень близкие профили адсорбции в ряду Seph-C_n ($n=1\div7$), причем оба сорбируются на Seph-C_6. Однако они имеют различные профили адсорбции в ряду Seph-C_n-NH_2; в то время как клострипаин в значительной степени удерживается уже на Seph-C_4-NH_2, коллагеназа не связывается на этой колонке. В условиях эксперимента для полного удерживания фермента требуется сорбент с более длинной цепью, Seph-C_7-NH_2. Более того, связывание ферментов на Seph-C_4-NH_2 и на Seph-C_7-NH_2 количественно обратимо в обоих случаях при добавлении в элюирующий буфер 1,0 М NaCl.

На основании этого предварительного эксперимента становится ясным, что целесообразно разделять два фермента при пропускании неочищенного препарата через Seph-C_4-NH_2 для извлечения клострипаина и затем выделять коллагеназу хроматографией несвязавшихся белков на Seph-C_7-NH_2. Указанное последовательное использование двух колонок из ряда Seph-C_n-NH_2 дает возможность разделения и очистки обоих ферментов.

9.7. Методы элюирования

Систематические исследования по оптимизации элюирования белков с алкил-агароз выявили множество факторов, влияющих на элюирование; были найдены агенты, понижающие полярность, специфические «деформаторы», мягкие детергенты; кроме того, изучалось влияние концентрации денатурирующих веществ, изменения pH, температуры, ионной силы и состава буфера. Поскольку доступность гидрофобных положений на поверхности белка обусловлена, по-видимому, его конформацией, а удерживание белков на алкилагарозах зависит в основном от липофильности, размера, формы и локализации этих положений, то способы элюирования, описанные выше, могут приводить либо к непосредственному разрушению гидрофобных взаимодействий между адсорбентом и белком, либо к изменению конформации белка, либо к комбинации обоих эффектов.

Высокая селективность элюирования также может быть достигнута при применении биоспецифических лигандов, таких,

как коферменты, субстраты, специфические ионы металлов и аллостерические эффекторы, которые часто вызывают конформационные изменения в белках.

Гликогенфосфорилазу b можно элюировать с Seph-C_6 соединениями, уменьшающими полярность, например этиленгликолем [69]. При увеличении концентрации этого гликоля в элюирующем растворителе до 30% (об./об.) фермент десорбируется с той же колонки простым понижением pH элюирующего буфера до 5,6, что, как известно, приводит к определенным структурным изменениям в указанном ферменте. Добавление мочевины (1,0 моль/л) к элюирующему буферу также способствует десорбции фермента. Однако было установлено, что с точки зрения сохранения нативной конформации этого фермента (наивысшей каталитической активности и неизменного ответа на действие регуляторных метаболитов) оптимальным элюентом является 0,4 М имидазолцитрат (pH 7,0).

Термин «деформатор» был введен для соединений, вызывающих локализованное, довольно ограниченное конформационное изменение в белке, полностью и легко обратимое при удалении этого соединения. Разным белкам соответствуют различные специфические «деформаторы», и в литературе описаны многочисленные примеры ферментов, которые особенно чувствительны к специфическим катионам, анионам или незаряженным соединениям. Их влияние на структуру фермента часто выражается в обратимой инактивации последнего (изменение значений K_m или $V_{макс}$, или и той и другой величины), в изменении агрегационного состояния или констант связывания фермента с определенными лигандами. Такого рода соединения очень часто упоминаются в сообщениях об оптимизации методики определения активности данного фермента и относятся к неконкурентным ингибиторам, которые не должны присутствовать в аналитической пробе. Некоторые из этих соединений могут действовать как специфические «деформаторы», вследствие чего следует провести скрининг с помощью пробного набора для определения их эффективности как элюентов.

9.8. Примеры применения гидрофобной хроматографии

9.8.1. Использование фенил-сефарозы для очистки фактора увеличения колонии лимфоцитов (ФУКЛ) [70].

1) Используют неочищенный экстракт, полученный осаждением сульфатом аммония кондиционированной среды из культуры стимулированных митогеном моноядерных клеток периферической крови.

2) После добавления сульфата аммония до 40% насыщения и последующего центрифугирования супернатант диализуют против 20 мМ фосфатного буфера (pH 6,8) и добавляют твердый NaCl до концентрации 4,0 моль/л.

3) Полученный раствор наносят на колонку (1,3×3 см), предварительно уравновешенную буфером А (4,0 М NaCl в 20 мМ фосфате, pH 6,8).

4) Колонку промывают буфером А (80 мл) и элюируют буфером Б

(0,5 М NaCl в 10 мМ фосфате, pH 7,1; 80 мл) со скоростью потока 16—18 мл/ч.

5) Наносят 80 мл вязкого буфера В (4,0 М гуанидинхлорид в 20%-ном этиленгликоле, pH 12,0); скорость потока понижают до 7—8 мл/ч.

6) В заключение колонку промывают 50%-ным (об./об.) водным этанолом и водой и уравновешивают буфером.

7) Активные фракции (устанавливают путем контроля концентрации белка) объединяют и концентрируют путем лиофилизации или ультрафильтрации на мембране UM-10 Diaflo (в случае фракций, элюированных

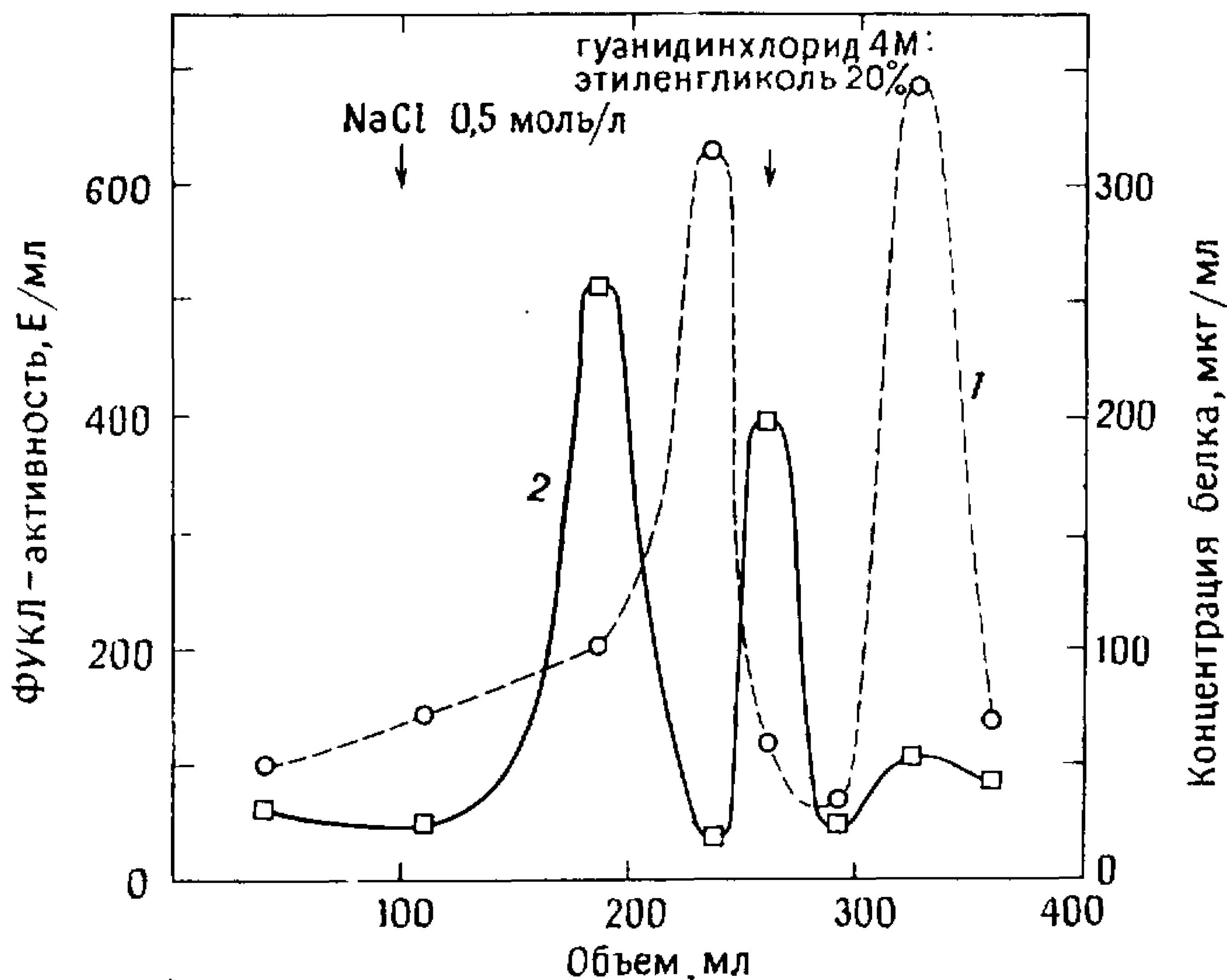


Рис. 16. Частичная очистка ФУКЛ из Т-лимфоцитов человека [74]. *1* — ФУКЛ-активность; *2* — концентрация белка.

4,0 М NaCl). Перед концентрированием фракции, содержащие гуанидинхлорид, необходимо диализовать против фосфатного буфера.

8) Перед анализом ФУКЛ-активности сконцентрированные фракции тщательно диализуют против фосфатного буфера (рис. 16). Измеряют ФУКЛ-активность двустадийным методом образования колонии иммунокомпетентных клеток лейкоцитов периферической крови [70].

9.8.2. Гидрофобная хроматография ферментов из галофильных бактерий с использованием градиентов сульфата аммония с уменьшающейся концентрацией

1) Собирают и центрифугируют клетки из ~6 л 4-дневной анаэробной культуры *Halobacterium*.

2) Твердый остаток после центрифугирования суспендируют в 4,3 М NaCl в 10 мМ фосфате (pH 7,3) и озвучивают в соникаторе Брэнсона, оборудованном микротипом.

3) Озвученную суспензию центрифугируют в течение 1 ч на ультрацентрифуге при 80 000 *g* (30 000 об/мин) и 25 °С.

4) Супернатант диализуют против 1,6 М сульфата аммония в 50 мМ фосфате натрия (pH 6,6) и центрифугируют, как описано выше.

5) К супернатанту добавляют твердый сульфат аммония до конечной концентрации 2,5 моль/л.

Таблица 11. Элюирование двух галофильных ферментов градиентом сульфата аммония с уменьшающейся концентрацией

Адсорбент	Концентрация $(NH_4)_2SO_4$, моль/л	
	Глутаматдегидрогеназа	Малатдегидрогеназа
Сефароза 4B	1,44	1,70
КМ-целлюлоза	1,84	2,06
ГМД-агароза	1,18	—
ДЭАЭ-целлюлоза	Не элюируется[а]	Не элюируется[а]
Целит	3,11	3,53
Растворимость[б]	3,01	3,32

[а] Ферменты элюируются только 0,4 M $(NH_4)_2SO_4$ [глутаматдегидрогеназа при 0,3 M $(NH_4)_2SO_4$]. Однако ферменты можно элюировать градиентом NaCl.

[б] Концентрация сульфата аммония, при которой в супернатанте обнаружено 50% активности фермента.

6) Перемешивают в течение 1 ч, суспензию центрифугируют и отделяют супернатант.

Колоночная хроматография. Хроматографию проводят на сефарозе 4B, КМ-целлюлозе, ГМД-агарозе, ДЭАЭ-целлюлозе или целите [71]. Весь процесс можно проводить при комнатной температуре.

1) Колонку упаковывают гелем и промывают несколькими объемами 2,5 M сульфата аммония в 50 мМ фосфатном буфере (pH 6,6).

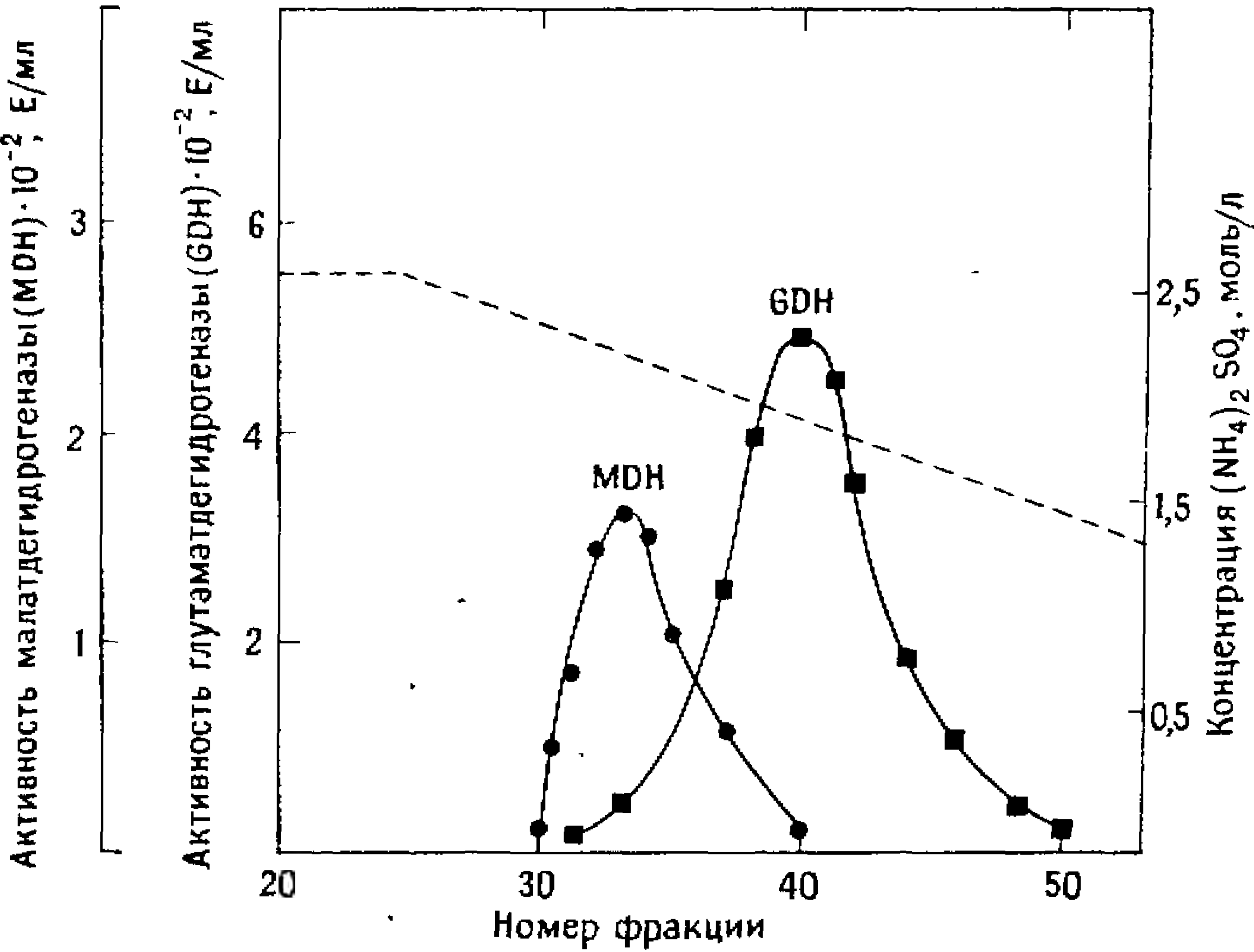


Рис. 17. Фракционирование с использованием сульфата аммония глутаматдегидрогеназы (GDH) и малатдегидрогеназы (MDH) из *Halobacterium* на КМ-целлюлозе [71].

2) На колонку наносят бактериальный экстракт и промывают 2,5 М сульфатом аммония (около одного объема колонки).

3) Вводят на колонку линейный градиент с уменьшающейся концентрацией сульфата аммония (от 2,5 до 0,5 моль/л) и элюируют при скорости потока 18—35 мл/ч. Анализируют фракции поочередно на глутаматдегидрогеназную и малатдегидрогеназную активность. Типичные результаты представлены в табл. 11 и на рис. 17.

10. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ИНГИБИТОРОВ В ХРОМАТОГРАФИИ ПЕПСИНОВ

10.1. Приготовление аффинных сорбентов

10.1.1. Адсорбенты с низкой концентрацией иммобилизованного ингибитора.

1) Метиловый эфир ε-аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланина (250 мг) растворяют в минимальном объеме диметилформамида и добавляют триэтиламин (76 мкл) и сепарон H1000 (гидроксиалкилметакрилатный гель), модифицированный эпихлорогидрином (4 г, содержание эпоксидных групп 800 мкмоль/г).

2) Смесь встряхивают в течение 48 ч, отфильтровывают, промывают водой до нейтральной реакции промывных вод и затем этанолом и эфиром.

3) Продукт промывают 6,0 М раствором хлорогидрата гуанидина и водой, сушат для анализа до постоянной массы при 105 °С и помещают в соответствующий буфер для аффинной хроматографии. (При первоначальной концентрации трипептида в растворе 0,02, 0,04, 0,12 и 0,25 моль/л высушенный продукт содержит соответственно 0,85, 1,2, 2,5 и 4,5 мкмоль аффинного лиганда/г.)

10.1.2. Адсорбенты с высокой концентрацией иммобилизованного ингибитора.

1) Метиловый эфир ε-аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланина (11,1 г) растворяют в небольшом объеме метанола и доводят объем до 75 мл буфером Бриттона — Робинсона (рН 11,0).

2) 30 мл этого раствора встряхивают с 5 г сухого геля (сепарон H300, содержание эпоксидных групп 600 мкмоль/г), суспензию фильтруют и гель промывают водой, 6,0 М раствором хлорогидрата гуанидина и в заключение водой.

3) Дальнейшую обработку проводят как в разд. 10.1.1. Содержание связанного ингибитора составляет 155 мкмоль/г сухого носителя.

10.2. Хроматография пепсина свиньи на колонках с ε-аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланилметил-сепароном с различными концентрациями иммобилизованного ингибитора

Раствор пепсина (1 г/200 мл) в 0,1 *М* ацетатном буфере (pH 4,5) наносят на колонку (9×0,8 см) с ε-аминокапроил-L-Phe-D-Phe-OCH_3-сепароном, полученным, как описано в разд. 10.1, и уравновешенным 0,1 *М* раствором ацетата натрия (pH 4,5). Колонку промывают уравновешивающим буфером и

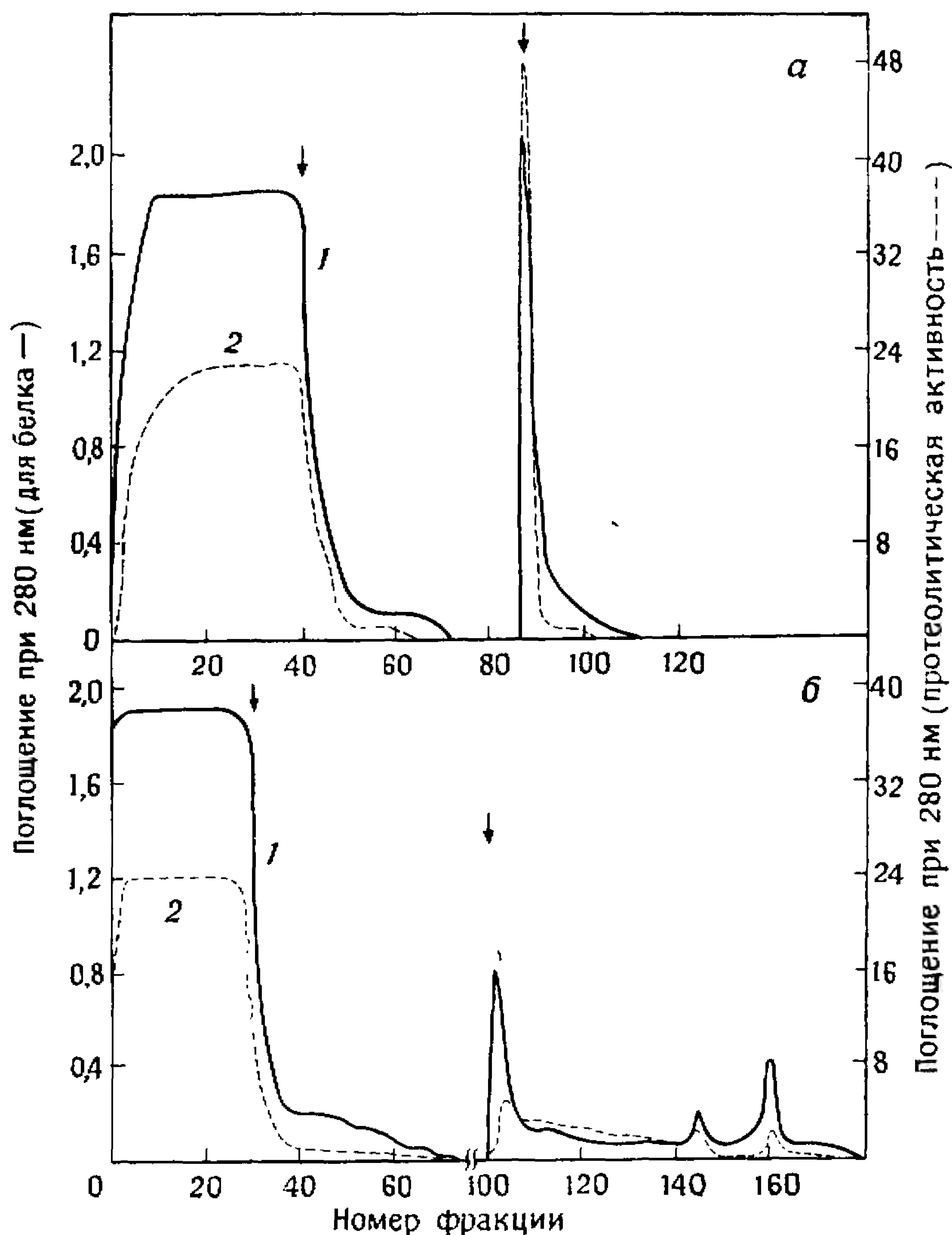


Рис. 18. Аффинная хроматография пепсина свиньи на колонках с ε-аминокапроил-L-Phe-D-Phe-OMe-сепароном с низкой (*а*) и высокой (*б*) концентрациями иммобилизованного ингибитора [72]. Концентрация ингибитора (мкмоль/г сухого носителя): *а* — 0,85; *б* — 155. *1* — концентрация белка; *2* — протеолитическая активность.

затем десорбируют пепсин 0,1 М ацетатным буфером (pH 4,5), содержащим 1,0 ммоль/л хлорида натрия. Типичные результаты по очистке пепсина свиньи приведены на рис. 18.

11. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ВИТАМИН B_{12}, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В работе [73, 74] выделены витамин B_{12}-связывающие белки с использованием аффинной хроматографии на витамин B_{12}-сефарозе. Производные витамина B_{12} можно получить частичным кислотным гидролизом (в 0,4 М HCl в течение 64 ч при комнатной температуре) амидных групп незамещенных пропионамидных боковых цепей корринового кольца витамина B_{12}. Полученная смесь моно-, ди- и трикарбоксипроизводных витамина B_{12} может быть разделена хроматографией на QAE-сефадексе.

11.1. Присоединение производных витамина B_{12} к 3,3′-диаминодипропиламинзамещенной сефарозе

1) Лиофилизованные производные витамина B_{12} растворяют в воде до концентрации 10,7 мкмоль/мл.

2) Добавляют 30 мл этого раствора и 4,3 мл воды в стакан, содержащий 30 мл (упакованный объем) 3,3′-диаминодипропиламинзамещенной сефарозы, и перемешивают на магнитной мешалке при 22 °С.

3) Увеличивают pH от 3,9 до 5,6 с помощью 0,2 М NaOH (~1,2 мл); добавляют 3,0 мл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (50 мг/мл) порциями по 0,6 мл с интервалом в 1 мин при постоянном перемешивании.

4) Продолжают осторожное перемешивание при комнатной температуре (22 °С) в темноте в течение 18 ч.

5) Отделяют замещенную сефарозу фильтрованием в вакууме на воронке Бюхнера и тщательно промывают при 22 °С дистиллированной водой (300 мл), 0,1 М глицин-NaOH (pH 10,0; 600 мл), дистиллированной водой (300 мл) и 0,1 М фосфатом калия (pH 7,0; 300 мл).

Промытая замещенная сефароза темно-красного цвета содержит 0,68 мкмоль витамина B_{12} на 1 мл упакованной сефарозы.

Литература

1. *Porath J.*, in: Methods in Enzymology, Vol. 34, Jakoby W. B., Wilchek M. (eds.), Academic Press, Inc., London and New York, 1974, p. 13.
2. *Gribnau T. C. J., van With T., van Sommeren A., Roeles F., van Hell H., Schuurs A.*, INSERM (Colloquium on Affinity Chromatography), **86**, 175 (1979).
3. *Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.*, Nature, **258**, 298 (1975).

4. *Sundaram P. V., Hornby W. E.*, FEBS Lett., **10**, 325 (1970).
5. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
6. *Weetall H. H.*, Nature, **223**, 959 (1969).
7. *Alebic-Kolbah T., Rendic S., Fuks Z., Sunjic V., Kajfez F.*, Acta Pharm. Jugoslav., **29**, 53 (1979).
8. *Stewart K. K., Doherty R. F.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **70**, 2850 (1973).
9. *Lagercrantz C., Larsson T., Karlsson H.*, Anal. Biochem., **99**, 352 (1979).
10. *Lagercrantz C., Larsson T., Denfors I.*, Comp. Biochem. Physiol., **69C**, 375 (1981).
11. *Allenmark S.*, Chem. Ser., **20**, 5 (1982).
12. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.*, J. Chromatogr., **237**, 473 (1982).
13. *Allenmark S., Bomgren B.*, J. Chromatogr., **252**, 297 (1982).
14. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.*, J. Chromatogr., **264**, 63 (1983).
15. *Bristow P. A., Brittain P. N., Riley C. M., Williamson B. F.*, J. Chromatogr., **131**, 57 (1977).
16. *Allenmark S.*, J. Biochem. Biophys. Methods., **9**, 1 (1984).
17. *Allenmark S., Bomgren B., Andersson S.*, Prep. Biochem., **14**, 139 (1984).
18. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H., Lagerstrom P.-O.*, Anal. Biochem., **136**, 293 (1984).
19. *Curthoys N. P., Hughey R. P.*, Enzyme, **24**, 383 (1979).
20. *Tate S. S., Meister A.*, Mol. Cell. Biochem., **39**, 357 (1981).
21. *Stromme J. H., Theodorsen L.*, Clin. Chem., **22**, 417 (1976).
22. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.*, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
23. *Dulley J. R., Grieve P. A.*, Anal. Biochem., **64**, 136 (1975).
24. *Davis B. J.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
25. *Prusak E., Siewinski M., Szewczuk A.*, Clin. Chim. Acta, **107**, 21 (1980).
26. *Ouchterlony O.*, Acta Pathol. Microbiol., **26**, 507 (1949).
27. *Szewczuk A., Baranowski T.*, Biochem. Zeit., **338**, 317 (1963).
28. *Milnerowicz H., Prusak E., Siewinski M., Ziomek E., Kustrzeba-Wojcicka I., Szewczuk A.*, Arch. Immunol. Ther. Exp., **29**, 543 (1981).
29. *Tate S. S., Meister A.*, J. Biol. Chem., **250**, 4619 (1975).
30. *Livingston D. M.*, in: Methods in Enzymology, Vol. 34B, Jakoby W. B., Wilchek M. (eds.), Academic Press Inc., New York, 1974, p. 723.
31. *March S. C., Parikh J., Cuatrecasas P.*, Anal. Biochem., **60**, 149 (1974).
32. *Prusak E., Kurowska E., Szewczuk A.*, Arch. Immunol. Ther. Exp., **31**, 613 (1983).
33. *Albert Z., Szewczuk A., Albert W.*, Neoplasma, **24**, 49 (1977).
34. *Tate S. S., Meister A.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **73**, 2599 (1976).
35. *Sternbach H., Engelhardt R., Lezius A. C.*, Eur. J. Biochem., **60**, 51 (1975).
36. *Teissere M., Penon P., Azou Y., Ricard J.*, FEBS Lett., **82**, 77 (1977).
37. *Jaehning J. A., Woods P. S., Roeder R. G.*, J. Biol. Chem., **252**, 8762 (1977).
38. *Smith S. S., Braun R.*, Eur. J. Biochem., **82**, 309 (1978).
39. *Zillig W., Stetter K. O., Tobien M.*, Eur. J. Biochem., **91**, 193 (1978).
40. *Spindler S. R., Duester G. L., D'Alessio J. M., Paule M. R.*, J. Biol. Chem., **253**, 4669 (1978).
41. *Spindler S. R., D'Alessio J. M., Duester G. L., Paule M. R.*, J. Biol. Chem., **253**, 6242 (1978).
42. *Brennessel B. A., Buhrer D. P., Gottlieb A. A.*, Anal. Biochem., **87**, 411 (1978).
43. *Bickle T. A., Pirotta V., Imber R.*, Nucleic Acids Res., **4**, 2561 (1977).
44. *Waldman A. A., Marx G., Goldstein J.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **72**, 2352 (1975).
45. *Ber E., Muszynska G., Tarantowicz-Marek E., Dobrowolska G.*, in: Proceedings of the Fifth International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition, Annapolis, Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh J. (eds.), Academic Press, New York, 1983.
46. *Bradford M. M.*, Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
47. *Axen H., Ernback S.*, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).

48. *Iverius P. H.*, Biochem. J., **124**, 677 (1971).
49. *Rahmsdorf H. J., Pai Sh.-H.*, Biochim. Biophys. Acta, **267**, 339 (1979).
50. *Chambon P.*, Annu. Rev. Biochem., **44**, 613 (1975).
51. *Jendrisak J., Guilfoyle T. J.*, Biochemistry (Wash.), **17**, 1322 (1978).
52. *Jongstaff C.*, Ph. D. Thesis, University of Liverpool (1983).
53. *Heyns W., deMoor P.*, Biochim. Biophys. Acta, **358**, 1 (1974).
54. *Dean P. D. G., Watson D. H.*, J. Chromatogr., **165**, 301 (1979).
55. *Bünemann H., Müller W.*, Nucleic Acids Res., **5**, 1059 (1978).
56. *Bünemann H., Müller W.*, in: Affinity Chromatography, Hoffmann-Ostenhof O. et al. (eds.), Pergamon Press, New York, 1978, p. 353.
57. *Koller B., Delius H., Bünemann H., Müller W.*, Gene, 4, 227 (1978).
58. *Beech W. F.*, Fibre-reactive Dyes, published by Logos Press, London, 1970.
59. *Wiedinger G., Klotz G., Goebel W.*, Plasmid, **2**, 377 (1979).
60. *Karn J., Brenner S., Barnett L., Cesarchi H.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 5172 (1980).
61. *Vincent W. S., Goldstein E. S.*, Anal. Biochem., **110**, 123 (1981).
62. *Shatle D., Koshland D., Weinstock G. H., Bornstein D.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **77**, 5375 (1980).
63. *Bryngelsson T., Pero W. R.*, Acta Chem. Scand., **60**, 456 (1980).
64. *Craven D. B., Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 329 (1974).
65. *Shaltiel S.*, in: Methods in Enzymology, Vol. 104, 69 (1984).
66. *Halperin G., Breitenbach M., Tauber-Finkelstein M., Shaltiel S.*, J. Chromatogr., **215**, 211 (1981).
67. *Shaltiel S., Ev-El Z.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **70**, 778 (1973).
68. *Kula M. R., Halef-Haghir D., Tauber-Finkelstein M., Shaltiel S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**, 389 (1976).
69. *Shaltiel* S., FEBS Proceedings, **46**, 117 (1975).
70. *Werber M. M., Daphna D., Goldman J., Joseph D., Rednay J., Rozenszajn L. A.*, Immunology, **50**, 261 (1953).
71. *Mevarech M., Weicht W., Werber M. M.*, Biochemistry (Wash.), **15**, 2383 (1976).
72. *Turkova J., Blaha K., Adanova K.*, J. Chromatogr., **236**, 375 (1982).
73. *Allen R. M., Majerus P. W.*, J. Biol. Chem., **247**, 7695 (1972).
74. *Allen R. M., Majerus P. W.*, J. Biol. Chem., **247**, 7702 (1972).

Глава 6

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Д. Винзор (Donald J. Winzor)

1. ВВЕДЕНИЕ

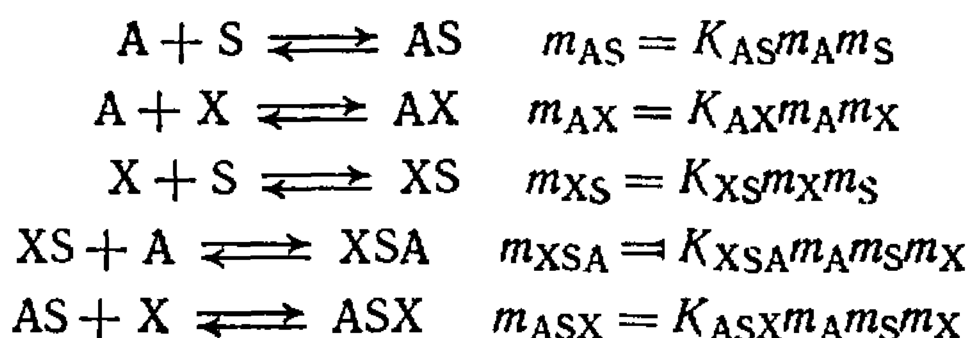
Применение аффинной хроматографии в качестве метода изучения взаимодействий находится еще на ранней стадии развития, несмотря на то что количественная аффинная хроматография была введена уже десять лет назад [1—3]. Действительно, количество исследований, касающихся методологических аспектов аффинной хроматографии, примерно равно количеству сообщений по применению этого метода в конкретных экспериментальных системах. Большинство этих исследований способствовало применению аффинной хроматографии для оценки равновесия с участием ферментов и модификаторов, ингибиторов или субстратов [1—12], но метод был также использован и для характеристики взаимодействий белок — лекарственный препарат [13], система антиген — антитело [14] и, в меньшей степени, белок-белковых взаимодействий [15, 16]. По существу метод заключается в иммобилизации биоспецифической реагирующей группы X на инертной хроматографической матрице (например, часто на сефарозе) и определении средневзвешенных величин объема элюирования $\bar{V}_A$ для распределяющегося растворенного вещества A в ряде хроматографических экспериментов, в которых растворенное вещество мигрирует в присутствии различных концентраций лиганда S, также специфически взаимодействующего с A и/или X. В некоторых примерах различные изменения значения $\bar{V}_A$ отражали конкуренцию между растворенными и иммобилизованными реагентами за одно и то же положение в A [2—5, 7—14]; в других изменения в величинах $\bar{V}_A$ были обусловлены наличием взаимодействия иммобилизованного реагента X с бинарным AS-комплексом, образованным растворенным веществом и растворимым лигандом [1, 6]. Цель количественной аффинной хроматографии — объяснить возникновение изменений в величинах $\bar{V}_A$ в предложении существования тех или иных равновесий. Поскольку положение равновесия зависит от концентрации (в соответствии с законом действия масс), точное определение состава смеси реагентов, к которой относится $\bar{V}_A$, обеспечивает применение фронтальной хроматографии [3, 4].

2. ОСНОВНЫЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ВЫРАЖЕНИЯ

Первоначально количественная аффинная хроматография ограничивалась определением констант ассоциации для систем, в которых распределяющееся вещество А, находящееся в растворе, имело только одно положение для взаимодействия с Х и/или S, но последующее развитие метода [17—19] дало возможность учитывать и мультивалентность растворенного вещества. Существующая теория, однако, ограничена или системами, в которых не происходит распределения растворенного вещества по гелю, или системами с достаточно небольшим лигандом, что позволяет считать хроматографические распределительные характеристики для А и всех AS_i-комплексов очень близкими. Первый отмеченный случай, вероятно, наблюдается, когда и растворенное вещество и лиганд — макромолекулярные соединения; при этом можно выбрать подходящий аффинный адсорбент, исключающий реагент большей молекулярной массы. Хотя теория мультивалентных растворенных веществ должна, разумеется, включать также и специальный случай одновалентного вещества, концепции количественной аффинной хроматографии легче понять при первоначальном рассмотрении простейших ситуаций.

2.1. Системы с одновалентным распределяющимся веществом

В исчерпывающем исследовании фронтального хроматографического поведения аффинной системы, в которой растворенное вещество А имеет единственное положение для взаимодействия с Х и S [3], рассматривались следующие равновесия, отражающие возможные взаимодействия в аффинной хроматографии:



$$A + S \rightleftharpoons AS \qquad m_{AS} = K_{AS} m_A m_S$$
$$A + X \rightleftharpoons AX \qquad m_{AX} = K_{AX} m_A m_X$$
$$X + S \rightleftharpoons XS \qquad m_{XS} = K_{XS} m_X m_S$$
$$XS + A \rightleftharpoons XSA \qquad m_{XSA} = K_{XSA} m_A m_S m_X$$
$$AS + X \rightleftharpoons ASX \qquad m_{ASX} = K_{ASX} m_A m_S m_X$$

Предполагается, что в этих выражениях молярная концентрация каждого равновесного компонента одинакова во всех частях колонки, доступных для этого ряда, причем лиганд Х однородно распределен в том же самом объеме, что и А. Эти соотношения соответствуют общему случаю, когда в системе, подвергающейся аффинной хроматографии, присутствуют все равновесия; для реальных ситуаций аффинных экспериментов, когда три из пяти констант равновесия равны нулю, был введен ряд выражений [3], суммированных в табл. 1, причем V_A — объем элюирования А в эксперименте, проведенном только с А

при тех же концентрациях $\bar{m}_A$, к которым относится $\bar{V}_A$; а V_A^* — объем элюирования при отсутствии взаимодействия растворенного вещества с матрицей (в примерах 1 и 2 $V_A = V_A^*$). Если же А взаимодействует с X (примеры 3 и 4), то этот объем элюирования для несвязавшегося растворенного вещества может быть получен или экстраполяцией результатов к бесконечно большой концентрации конкурирующего лиганда S, или проведением эксперимента с той же самой матрицей, не содержащей групп X [2, 3, 20]. В табл. 1 включены альтернативные выражения для этих двух случаев с использованием разности ($\bar{V}_A$—$\bar{V}_A^*$) для систем, где V_A^* более легко определяется, чем V_A ввиду слишком большого значения последнего. В ранних вариантах [3, 21] табл. 1 вместо V_A^* в правые части уравнений входил объем стационарной фазы V_S, и таким образом объем, в котором находятся участки связывания матрицы, учитывался некорректно [22].

2.2. Системы с мультивалентным растворенным веществом

В случае когда распределяемое вещество содержит более одного положения для взаимодействия с участками связывания матрицы, приведенные выше химические равновесия остаются в силе, но необходимо рассмотреть дополнительные равновесия для образования комплексов AX_i, в которых одна молекула А образует поперечные связи между несколькими положениями матрицы. Первоначальные работы, рассматривавшие мультивалентность растворенного вещества [3, 12], ограничивались ситуацией, при которой стерические трудности исключали такого рода мультивалентное связывание А с матрицей. В этих особых условиях полученные экспериментально в нескольких системах при очень низких значениях $\bar{\bar{m}}_X$ [6, 14] зависимости, построенные в соответствии с отношениями, приведенными в табл. 1, линейны и дают k_{AX} — истинную константу ассоциации [23] или константу связывания [24] для взаимодействия между матрицей и распределяемыми растворенными компонентами (А или AS_i). Однако использование аффинной колонки с более высокой концентрацией участков связывания на матрице приводит к отклонению указанных зависимостей от линейности [14, 17], что свидетельствует о несоблюдении принятого допущения об отсутствии мультивалентного связывания, находящегося в растворе вещества с матрицей.

Применение законов теории вероятности к числу реагирующих положений [25—27] привело [18, 19] к получению общего решения проблемы мультивалентности распределяющегося растворенного вещества для случаев, при которых несколько взаимодействий f-валентного А с X можно описать в терминах константы моновалентного связывания k_{AX}. Первоначально [18, 19]

Таблица 1. Системы аффинной хроматографии, в которых включение лиганда S в элюирующий буфер влияет на объем элюирования одновалентного растворенного вещества А. Зависимость объема элюирования от присутствия лиганда в случае действительного равновесия

Пример	Истинные константы равновесия	Зависимость объема элюирования от концентрации лиганда
1	K_{AS}, K_{ASX}	$\frac{1}{\bar V_A - V^*_A} = \frac{1}{V^*_A m_X K_{AS} K_{ASX} m_S} + \frac{1 + K_{ASX} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{ASX}}$
2	K_{XS}, K_{XSA}	$\frac{1}{\bar V_A - V^*_A} = \frac{1}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{XS} K_{XSA} m_S} + \frac{1 + K_{XSA} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{XSA}}$
3	K_{AS}, K_{AX}	$\frac{1}{\bar V_A - V_A} = -\left[\frac{(1 + K_{AX} \bar m_A)^2}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX} K_{AS} m_S} + \frac{1 + K_{AX} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}}\right]$; $\frac{1}{\bar V_A - V^*_A} = \frac{K_{AS} m_S}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}} + \frac{1 + K_{AX} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}}$
4	K_{AX}, K_{XS}	$\frac{1}{\bar V_A - V_A} = -\left[\frac{(1 + K_{AX} \bar m_A)^2}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX} K_{XS} m_S} + \frac{1 + K_{AX} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}}\right]$; $\frac{1}{\bar V_A - V^*_A} = \frac{K_{XS} m_S}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}} + \frac{1 + K_{AX} \bar m_A}{V^*_A \bar{\bar m}_X K_{AX}}$

Некоторые замечания к табл. 1.

1) Примеры 1 и 2 описывают аффинную хроматографическую систему, в которой величины $\bar V_A$ увеличиваются с увеличением концентрации лиганда, в то время как примеры 3 и 4 — случай конкурентного элюирования, когда увеличение m_S приводит к уменьшению объема элюирования.

2) Точная интерпретация результатов эксперимента возможна при условии, что исследована также концентрационная зависимость объемов элюирования отдельных реагентов (А и S).

3) Наряду с использованием концентрационной зависимости $\bar V_A$ при фиксированной концентрации лиганда m_S константы равновесия можно находить графически из зависимости $1/(\bar V_A - V_A)$ от $1/m_S$ [или $1/(\bar V_A - V_A^*)$ от m_S (примеры 3 и 4)]. Такой подход вытекает из соотношений, приведенных в табл. 1.

4) Во все соотношения входит суммарная концентрация растворенного вещества в жидкой фазе $\bar m_A$, определение этой величины не вызывает проблем при фронтальной хроматографии, но она неизвестна и постоянно меняется в случае зональной хроматографии.

5) Теоретические отношения содержат также параметр $\bar{\bar m}_X$ — суммарная концентрация доступных положений связывания на матрице, величина которой может быть существенно меньше значения, установленного химическими анализом аффинной матрицы.

Таблица 2. Системы аффинной хроматографии, в которых включение лиганда S в элюирующий буфер влияет на объем элюирования f-валентного растворенного вещества A

Пример	Истинные константы равновесия	Зависимость объема элюирования от концентрации лиганда
1	k_{AS}, k_{ASX}	$k_{ASX} = \frac{(1 + k_{AS}m_S)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}\{\overline{\overline{m}}_X - f\overline{m}_A(\overline{V}_A/V^*_A)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]\}k_{AS}m_S}$
2	k_{XS}, k_{XSA}	$k_{XSA} = \frac{(1 + k_{XS}m_S)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}\{\overline{\overline{m}}_X - f\overline{m}_A(\overline{V}_A/V^*_A)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]\}k_{XS}m_S}$
3	k_{AS}, k_{AX}	$k_{AX} = \frac{(1 + k_{AS}m_S)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}\{\overline{\overline{m}}_X - f\overline{m}_A(\overline{V}_A/V^*_A)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]\}}$
4	k_{AX}, k_{XS}	$k_{AX} = \frac{(1 + k_{XS}m_S)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}\{\overline{\overline{m}}_X - f\overline{m}_A(\overline{V}_A/V^*_A)[1 - (V^*_A/\overline{V}_A)^{1/f}]\}}$

для экспериментов по распределительному равновесию были составлены выражения, куда вошли концентрации растворенного в жидкой фазе вещества $\bar{m}_A$ и его суммарная концентрация в системе $\bar{\bar{m}}_A$. Эти выражения могут быть превращены в форму, лучше соответствующую экспериментам фронтальной хроматографии [22]; при этом $V_A{}^*\bar{\bar{m}}_A=\bar{V}_A\bar{m}_A$ выражает необходимое условие сохранения массы. Из табл. 2, в которой приведены выражения для ситуаций, наблюдаемых при хроматографии одновалентных растворенных веществ, видно, что установление значения $\bar{\bar{m}}_X$ — общей эффективной концентрации положений связывания на матрице — необходимо для количественной оценки экспериментальных результатов в терминах двух истинных констант равновесия.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принимая во внимание, что суммарная концентрация доступных положений матрицы $\bar{\bar{m}}_X$ должна быть рассчитана по экспериментальным данным, колоночная хроматография представляет собой простейший метод количественной аффинной хроматографии, поскольку найденное из эксперимента значение $\bar{\bar{m}}_X$ затем будет использоваться в расчетах других экспериментов, выполненных на той же колонке с тем же растворенным веществом. Однако в некоторых примерах, особенно в случае биологических аффинных матриц, таких, как миофибриллы мышц [28], колоночный метод нельзя использовать из-за проблем, связанных со скоростью потока, поэтому в количественной аффинной хроматографии находят применение также эксперименты распределительного равновесия.

3.1. Колоночная хроматография

Методика проведения количественной аффинной хроматографии не отличается существенно от обычного колоночного эксперимента, за исключением необходимости проведения экспериментов в сравнительно небольшом масштабе. Тем не менее следует принять во внимание следующие соображения.

1) Поскольку химическое равновесие зависит от температуры, следует использовать колонку с рубашкой, поддерживая требуемую температуру с помощью термостата.

2) Для расчета констант равновесия требуется точное определение объемов элюирования, поэтому следует обеспечить достаточную точность в измерении величин $\bar{V}_A$. Если элюат собирается по фракциям для анализа, то количество каждой фракции можно наиболее точно определять по ее массе; с этой целью

рекомендуется собирать фракции в предварительно взвешенные пробирки. Можно также контролировать и замерять скорость потока в сочетании с постоянным контролем объема элюата.

3) Как отмечалось выше для табл. 1, количественные выражения содержат полную концентрацию распределяемого вещества $\overline{m}_A$, растворенного в подвижной фазе. Поэтому фронтальная хроматография имеет преимущество перед обычным зональным процессом.

Фронтальная хроматография отличается от зонального варианта лишь объемом раствора, вводимого на колонку. На колонку вводится объем раствора, достаточный для того, чтобы профиль элюирования содержал участок плато, в котором концентрации всех растворенных реагентов равны их концентрациям во вводимом растворе. Как и в зональном методе, рекомендуется элюирование буфером. Полученные таким образом кривые элюирования представляют собой комбинацию двух участков: начального участка (восходящий профиль), отражающего увеличение концентраций всех растворенных компонентов от нуля до концентраций наносимой на колонку смеси, и конечного участка (нисходящий профиль), соответствующего уменьшению концентраций всех компонентов от значения плато до нуля. В количественной аффинной хроматографии, где обычно используются процессы связывания, происходящие количественно, т. е. специфично для суммарной концентрации растворенного вещества, объем элюирования $\overline{V}_A$ может быть получен как среднее значение сечения (центроида) [29] начального или конечного участка кривой элюирования. Положение этого сечения определяется математическим выражением

$$\overline{V}_A = \frac{1}{\overline{m}^{\alpha}_A} \int_0^{\overline{m}^{\alpha}_A} V d\overline{m}_A \approx \frac{1}{\overline{m}^{\alpha}_A} \Sigma V \Delta \overline{m}_A \qquad (1)$$

где V — средний объем элюата, соответствующий увеличению концентрации растворенного вещества $\Delta\overline{m}_A$, а пределы суммирования (интегрирования) соответствуют координатам при $\overline{m}_A = 0$ и первоначальной концентрации растворенных компонентов на прямолинейном участке кривой (плато, $\overline{m}_A = \overline{m}_A{}^{\alpha}$). Более удобны для расчета $\overline{V}_A$ по результатам экспериментов, в которых колоночный элюат собирается по фракциям, следующие выражения:

Для начального участка кривой элюирования
$$\overline{V}_A = \frac{1}{\overline{m}^{\alpha}_A} \left[V' - \sum_0^{V'} \overline{m}_A \Delta V \right] \qquad (2а)$$

Для конечного участка кривой элюирования
$$\overline{V}_A = \frac{1}{\overline{m}^{\alpha}_A} \left[\sum_0^{V''} \overline{m}_A \Delta V \right] \qquad (2б)$$

$\overline{m}_A$ — суммарное содержание растворенного вещества во фракции объемом ΔV, V' — объем элюата на участке кривой, соответствующей исходному составу (где $\overline{m}_A=\overline{m}_A\alpha$), а V'' — объем элюата на участке, соответствующем растворителю ($\overline{m}_A=0$) на конечном участке кривой элюирования. На восходящем участке профиля элюирования начало измерения объема совпадает с началом нанесения образца, в то время как конечный участок элюирования начинается после повторного введения растворителя на колонку. Следует отметить, что единственный фронтальный эксперимент дает два независимых определения объема элюата $\overline{V}_A$, при котором концентрация растворенного вещества составляет половину ее значения на участке плато при условии симметричности начального и конечного участков кривой.

Зональный метод количественной аффинной хроматографии [1, 2, 5] в настоящее время пользуется большей популярностью, чем фронтальный, главным образом из-за применения в последнем методе слишком большого количества растворенного вещества. Однако различия в требуемом количестве растворенного вещества не так велики, как может показаться на первый взгляд. Хотя в случае фронтального эксперимента объем вводимого раствора гораздо больше, концентрация может быть значительно ниже ввиду отсутствия далее в работе какого бы то ни было разбавления. Это положение становится совершенно очевидным из рис. 1, на котором представлены восходящие профили элюирования при различных концентрациях NADH при фронтальной аффинной хроматографии лактатдегидрогеназы печени крысы на колонке объемом 0,1 мл (0,08×5,0 см) с 10-карбоксидециламино-сефарозой в сравнении с соответствующими профилями, полученными при зональной хроматографии на колонке с тем же аффинным адсорбентом, объем которой в 10 раз больше (0,50×1,28 см) [20].

Количество лактатдегидрогеназы, использованной для получения фронтальных профилей (рис. 1, *а*) и, следовательно, двух значений $\overline{V}_A$, в каждом случае варьирует от 9 до 54 пкмоль (1—6 мл 9 нМ раствора фермента) по сравнению с 18 пкмоль фермента (0,1 мл, 180 нМ) для каждого зонального эксперимента (рис. 1, *б*). Следует также заметить, что в то время как фронтальные кривые дают возможность точного проведения среднего сечения независимо от изучаемой концентрации NADH, локализация эквивалентного положения в зональных профилях (рис. 1, *б*) становится все более трудной по мере уменьшения концентрации лиганда. В заключение следует отметить, что, хотя зональный метод более экономичен в отношении количества растворенного вещества, результаты, полученные этим методом, трудно интерпретировать без введения определенных упрощающих допущений. Упомянутое выше исследование биоспецифической десорбции лактатдегидрогеназы с 10-карбоксидециламино-

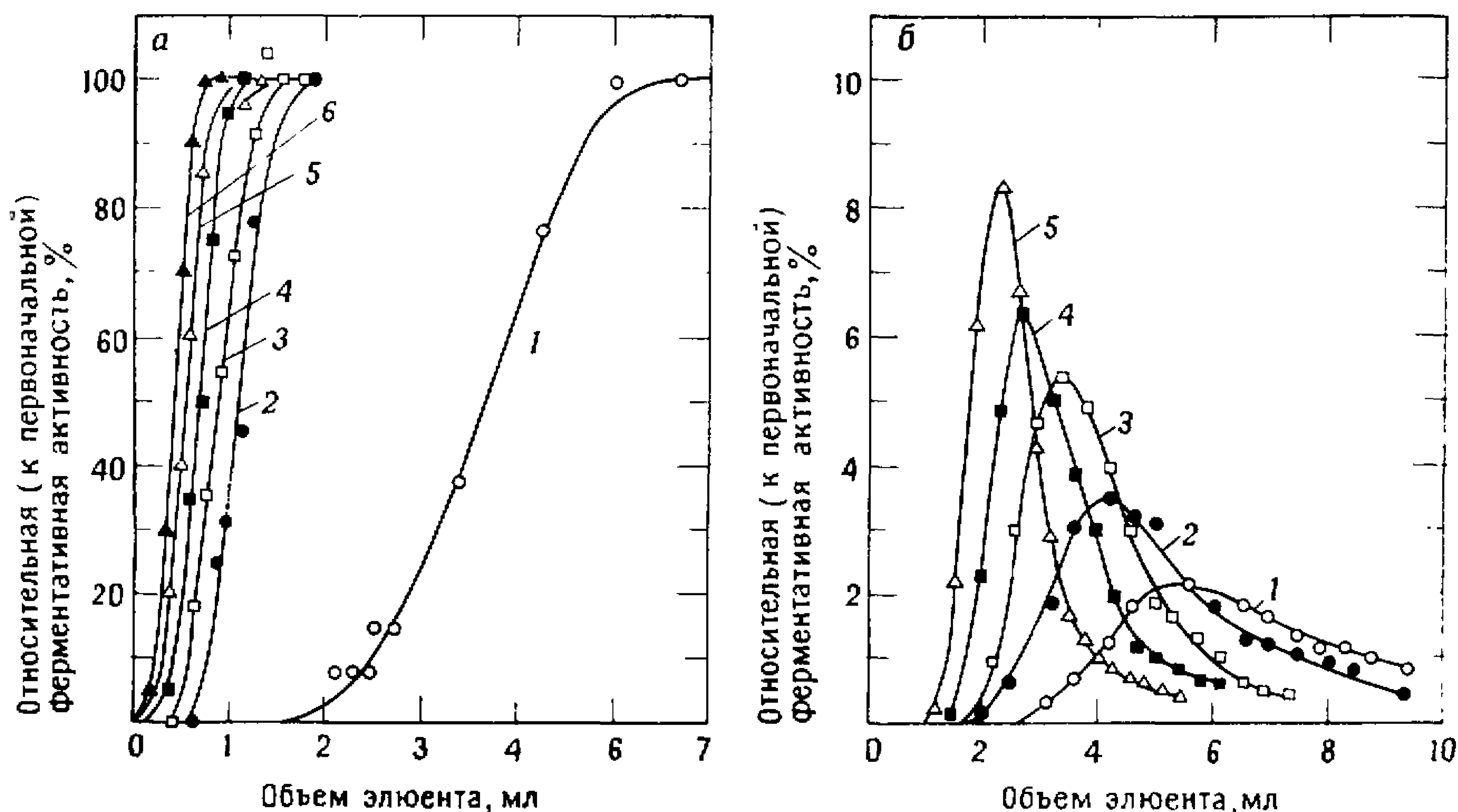


Рис. 1. Сравнение влияния концентрации NADH на кривые элюирования при фронтальной и зональной хроматографии лактатдегидрогеназы печени крысы на 10-карбоксидециламино-сефарозе. *а* — начальные участки кривых элюирования, полученные при фронтальной хроматографии фермента (9 нМ) на колонке (0,1 мл) в отсутствие NADH (*1*) и в присутствии 2 (*2*), 3 (*3*), 4 (*4*), 5 (*5*) и 6 мкмоль/л (*6*) кофермента; *б* — кривые элюирования, полученные при зональной хроматографии фермента (0,1 мл, 0,18 мкМ) на колонке (1,0 мл) в присутствии 8 (*1*), 10 (*2*), 12 (*3*), 15 (*4*) и 18 мкмоль/л (*5*) NADH [20]. (Воспроизведено с разрешения.)

сефарозы с помощью NADH [20] является вполне достаточным подтверждением того факта, что фронтальный метод может быть осуществлен с относительно небольшими количествами распределяемого растворенного вещества.

3.2. Эксперименты по распределительному равновесию

Вместо колоночной хроматографии можно провести серию экспериментов по распределительному равновесию, в которых для смесей с известной суммарной концентрацией $\bar{\bar{m}}_A$ концентрация растворенного вещества A в жидкой фазе $\bar{m}_A$ определяется непосредственно [3, 28]. При этом подходе смеси, содержащие известные количества матрицы и распределяющегося растворенного вещества (для наиболее точного определения их состава предпочтительно готовить смеси из навесок), выдерживают при определенной температуре до установления распределительного равновесия. Затем путем фильтрования [3] или центрифугирования [28] каждой смеси отделяют супернатант при той же температуре и определяют в нем содержание $\bar{c}_A$, например ферментным анализом. Объемы $\bar{V}_A$ и $V_A{}^*$, входящие в

соответствующие выражения табл. 1 и 2, могут быть затем получены из отношений $V_A{}^*\bar{\bar{c}}_A = \bar{V}_A\bar{c}_A$ и $\bar{\bar{c}}_A = w_A/V_A{}^*$, где w_A — масса распределяющегося растворенного вещества А, добавленного к суспензии, а $V_A{}^*$ (объем, доступный для А) определяется из эксперимента, когда нет взаимодействия А с участками связывания матрицы, или из экспериментов с матрицей, не содержащей Х-групп [3, 20]. Любые различия в объемах стационарной V_s и жидкой V_0 фаз при работе с различными смесями можно учесть, введя коэффициент распределения $K_{av}{}^*$ [30] и используя выражение $V_A{}^* = V_0 + K_{av}{}^*V$; объем жидкой фазы можно

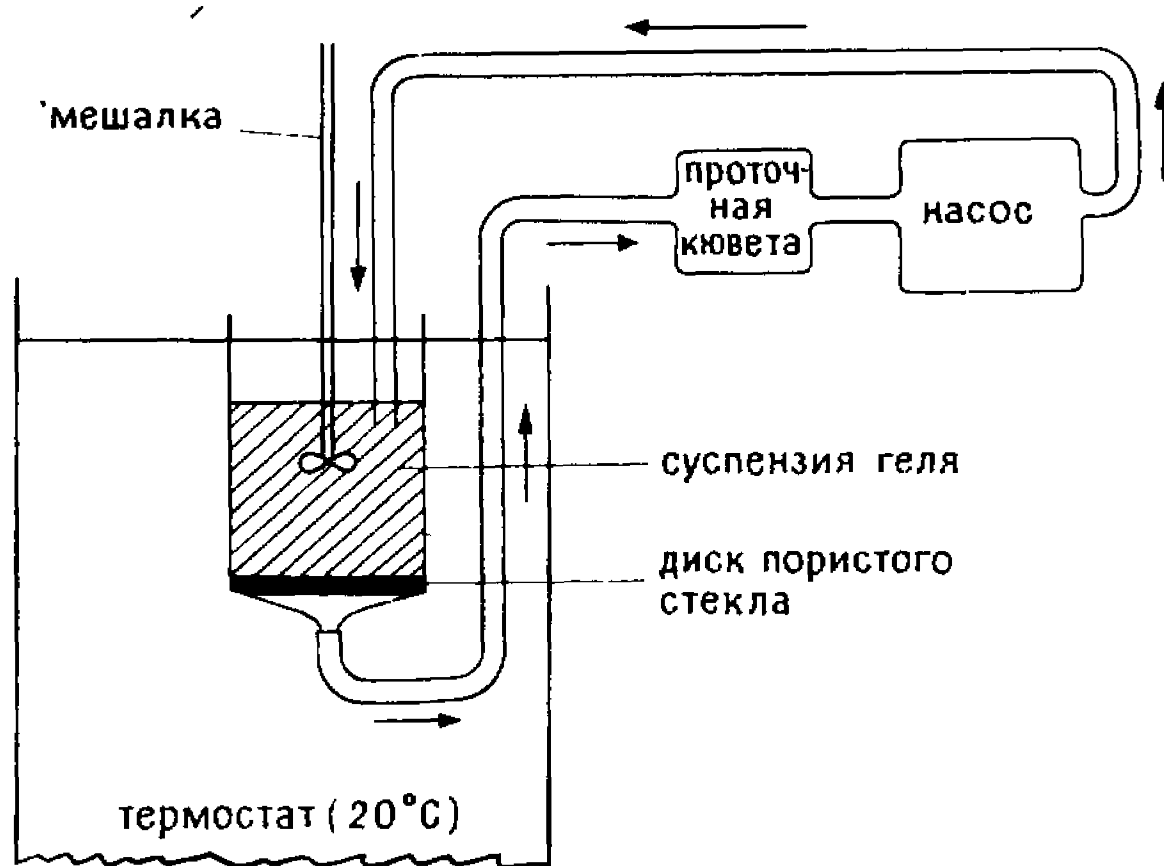


Рис. 2. Схема установки для изучения рециркулирующего распределительного равновесия [31]. (Воспроизведено с разрешения.)

найти из данных эксперимента, при котором растворенное вещество не взаимодействует со стационарной фазой и не проникает в нее.

К недостатку описанных выше распределительных экспериментов относится необходимость точного определения массы и, следовательно V_s [3], аффинной матрицы в каждой реакционной смеси. Хотя это требование не создает больших проблем при доступности матрицы в сухом виде, достоверность результатов нельзя гарантировать, если аликвота отбирается из концентрированной суспензии аффинной матрицы. Этой трудности иногда можно избежать, применяя рециркулирующую методику распределительного равновесия [18, 31], при которой жидкая фаза перемешиваемой суспензии аффинной матрицы и распределяющегося растворенного вещества анализируется спектрофотометрически при помощи проточной кюветы, помещенной в линию возвращения жидкой фазы в суспензию (рис. 2). Поэтому всю серию экспериментов по распределению можно провести с одной

и той же навеской сорбента, лишь несколько раз добавляя концентрированный раствор вещества к суспензии и поддерживая соответствующее значение $\bar{c}_A$ после каждого добавления. Дополнительным преимуществом рециркулирующей распределительной методики является возможность установления момента достижения равновесия в системе, как только непрерывно измеряемое поглощение жидкой фазы достигнет постоянного значения.

3.3. Проблема определения концентрации свободного лиганда

В количественные выражения для аффинной хроматографии (табл. 1 и 2) входит концентрация свободного лиганда m_S, которая совпадает с полной концентрацией лиганда $\bar{m}_S$ в смеси растворенного вещества и лиганда только в случае, когда S не взаимодействует с А или если $\bar{m}_S \gg \bar{m}_A$. Первоначально [3] $\bar{m}_S$ рассматривалась как наиболее доступная экспериментальная величина, и поэтому в графиках для количественного анализа моновалентных растворенных веществ в качестве концентрации лиганда чаще всего использовали значение $\bar{m}_S$, а не m_S. Однако поскольку в этом случае графики были нелинейны (примеры 1 и 3), то необходимо будет выполнять такие нежелательные построения, как проведение касательных в точках $1/m_S \to 0$. Далее, теоретически [17—19] вполне вероятно, что отклонение от линейности может быть обусловлено мультивалентностью растворенного вещества, вследствие чего применение касательных для расчетов оказывается неправильным подходом. Поскольку величины, полученные с использованием $\bar{m}_S$, нельзя считать достоверными, то надо определить m_S в смеси растворенное вещество — лиганд.

При изучении взаимодействий белок — лиганд методом аффинной хроматографии концентрация белка $\bar{m}_A$ составляет обычно <20 мкмоль (для белка с молекулярной массой 5000 — 1 мг/мл). Соответственно для исследований, требующих более милимолярной суммарной концентрации лиганда, использование $\bar{m}_S$ вместо m_S в выражениях, приведенных в табл. 1 и 2, не приводит к ошибке, поскольку соблюдается требование $\bar{m}_S \gg \bar{m}_A$. Однако, если $\bar{m}_S$ и $\bar{m}_A$ имеют сравнимые значения, необходимо различать параметры $\bar{m}_S$ и m_S и использовать последний параметр для количественной оценки аффинной хроматографии.

Хотя, вообще говоря, можно ставить несколько хроматографических экспериментов, основанных на параметрах $\bar{m}_X$, k_{AX}, k_{AS} и т. д., полученных с использованием $\bar{m}_S$ вместо m_S [6], гораздо более просто для определения m_S использовать исчерпывающий диализ растворенного вещества (белка) против раствора лиганда известной концентрации и применять продукт диффузии для предварительного уравновешивания аффинной матрицы. Отсутствие возможности последующего определения $\bar{m}_S$

несущественно, поскольку для применения выражений из табл. 1 и 2 необходима только концентрация лиганда m_S, однозначно определяемая стадией диализа. Ввиду относительно высокой ионной силы (для уменьшения неспецифических взаимодействий) и низкой концентрации растворенного вещества, применяемых в аффинной хроматографии, нет необходимости в поправке Доннана даже для заряженных лигандов.

4. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ МОНОВАЛЕНТНЫХ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Любая из приведенных выше методик эксперимента дает величины $\bar{m}_A$ и $\bar{V}_A$, на основании которых следует определить четыре параметра, а именно две истинные константы равновесия, $\bar{\bar{m}}_X$ (полную концентрацию доступных положений матрицы) и V_A^* (объем, доступный для А). Возможность такого определения иллюстрируется результатами [3] зависимого от глюкозы элюирования лизоцима с сефадекса G-100 (пример 3), т. е. к более сложной ситуации, при которой нет возможности непосредственного измерения V_A^* из-за взаимодействия между А и положениями связывания матрицы.

4.1. Полный анализ конкурентной аффинной системы

Результаты экспериментов по распределительному равновесию с системой сефадекс G-100 — лизоцим — глюкоза [3] представлены на рис. 3, который относится к экспериментам с $V_S = 4{,}44$ мл и $V_0 = 7{,}80$ мл. В этих экспериментах m_S считалась равной $\bar{m}_S$, так как полная концентрация фермента в жидкой фазе $\bar{m}_A$ несравнимо меньше (8,3 мкмоль/л), чем концентрация $\bar{m}_S$ глюкозы (0,17÷0,84 моль/л). Прежде всего из рис. 3, *а* виден линейный характер графика, построенного в обратных координатах, что указывает на правильность представления о лизоциме как о моновалентном растворенном веществе в данной системе: этот вывод обоснован в том смысле, что глюкоза, подобно N-ацетилглюкозамину [3], конкурирует, вероятно, с полисахаридной матрицей за единственное активное положение молекулы фермента. Обработка графика (рис. 3, *а*) с помощью линейного регрессионного анализа приводит к $(1+K_{AX}\bar{m}_A)^2/V_A^*K_{AS}K_{AX}\bar{\bar{m}}_X = 0{,}30$ и $(1+K_{AX}\bar{m}_A)/V_A^*K_{AX}m_X = 0{,}90$ (получены по тангенсу угла наклона прямой). Поскольку $\bar{V}_A \to V_A^*$ и $1/m_S \to 0$, то отсекаемый отрезок соответствует значению $1/(\bar{V}_A - V_A^*)$. Установлено, что $(V_A - V_A^*) = 1{,}11$ мл, $V_A = 11{,}73$ мл, $\bar{m}_A = 8{,}3$ мкмоль/л, откуда $V_A^* = 10{,}62$ мл. Характер графика на рис. 3, *б*, отражающего зависимость V_A от концентрации фермента в отсутствие глюкозы, определяется комбина-

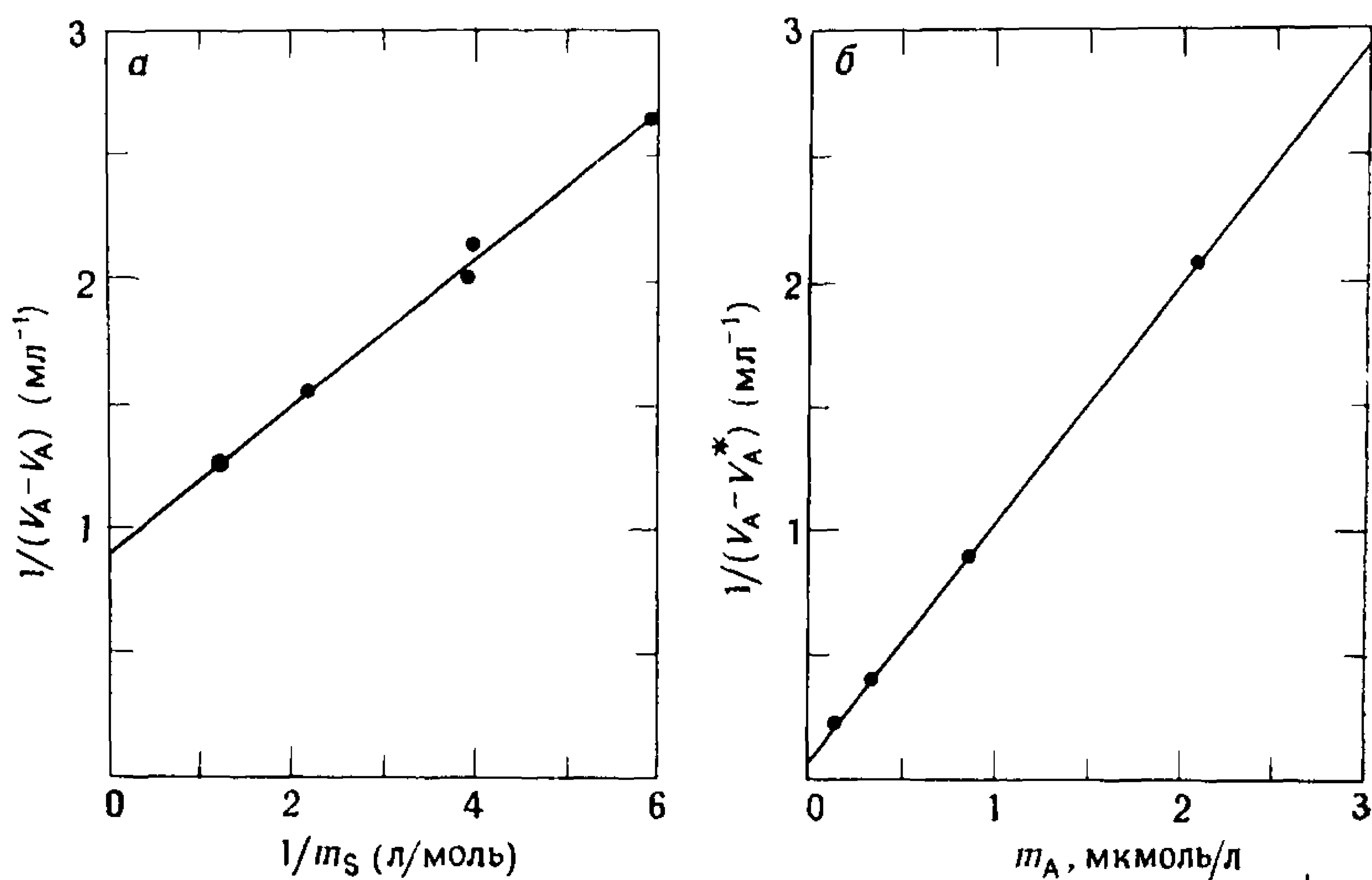


Рис. 3. Графическое определение констант равновесия для взаимодействия лизоцима с сефадексом G-100 (K_{AX}) и глюкозой (K_{AS}) с помощью количественной аффинной хроматографии. *а* — влияние концентрации глюкозы на объем элюирования $\bar{V}_A$ лизоцима в экспериментах с 8,3 мкМ фермента; *б* — концентрационная зависимость объема элюирования V_A для лизоцима в отсутствие глюкозы [3]. (Воспроизведено с разрешения.)

цией двух выражений для отсекаемого на оси ординат отрезка на рис. 3, *а*, что приводит к зависимости

$$\frac{1}{(V_A - V^*_A)} = \frac{1}{V^*_A K_{AX} \bar{\bar{m}}_X} + \frac{\bar{m}_A}{V^*_A \bar{\bar{m}}_X} \tag{3}$$

После определения тангенса угла наклона ($9{,}46 \cdot 10^4$) и величины отрезка, отсекаемого на оси ординат (0,079) по графику с одной обратной величиной (рис. 3, *б*), были получены значения $m_X = 1{,}0$ мкмоль/л и $K_{AX} = 1{,}2 \cdot 10^6$ М$^{-1}$. В заключение по наклону графика на рис. 3, *а* можно найти еще один параметр $K_{AS} = 30$ М$^{-1}$.

4.2. Анализ лигандзадерживаемых аффинных систем

До сих пор обсуждение было ограничено ситуацией, при которой распределяющееся растворенное вещество взаимодействует с положениями связывания матрицы (пример 3; также применимо к примеру 4). Теперь кратко рассмотрим примеры, где взаимодействие растворенного вещества с матрицей протекает через образование тройного комплекса. Ситуация, при которой растворимый AS-комплекс взаимодействует со связанными с матрицей X-положениями (пример 1), по-видимому, более часто

встречается в количественной аффинной хроматографии, чем другая возможность (пример 2), при которой S должен вначале взаимодействовать с X с образованием матрицы, содержащей S как ковалентно связанную часть иммобилизованного реагента XS. В любом случае очевидно, что на основании экспериментов в отсутствие лиганда невозможно получить никакие данные, кроме значения V_A^*; поэтому $\overline{\overline{m}}_X$ надо определять по экспериментальным данным со смесями растворенное вещество — лиганд.

Изучение выражений для примеров 1 и 2 табл. 1 показывает, что для зависимости, построенной в координатах $1/\overline{V}_A—V_A^*$ от $1/m_S$, отношение отсекаемого отрезка к тангенсу угла наклона дает численное значение для произведения $K_B(1+K_T\overline{m}_A)$, где K_B — константа бинарного равновесия ($K_B=K_{AS}$ для примера 1 либо $K_B=K_{XS}$ для примера 2), а K_T — константа тройного равновесия, т. е. K_{ASX} (пример 1) или K_{XSA} (пример 2). Следовательно, определение численного значения того же произведения из второй серии экспериментов, проведенных при других значениях $\overline{m}_A$, в принципе может привести к получению второго уравнения; располагая двумя уравнениями, можно оценить два параметра K_B и K_T, а затем найти m_X. В то же время график в координатах $1/(V_A—V_A^*)$ от m_A может быть использован для определения $\overline{\overline{m}}_X$ и K_T по наклону и отсекаемому отрезку путем определения зависимости V_A от концентрации растворенного вещества $\overline{m}_A$ в ряде экспериментов с достаточно высокой концентрацией лиганда (при очень большом значении K_Bm_S). Действительно, выражение для лигандзадерживаемой аффинной хроматографии в присутствии насыщающей концентрации лиганда становится формально идентичным используемому [уравнение (3)] для лигандускоряемых систем, причем единственными различиями являются замещение константы тройного равновесия (K_{ASX} или K_{XSA}) на константу двойного равновесия K_{AX}, а $\overline{V}_A$ — на V_A. В настоящее время отсутствуют сообщения об экспериментальных исследованиях сравнительных достоинств этих двух процессов.

4.3. Приближенный анализ результатов аффинной хроматографии

Описанный выше анализ системы сефадекс — лизоцим — глюкоза показал, что для характеристики этого конкурентного процесса (K_{AX}, K_{AS}) требуется ряд экспериментов с различными концентрациями растворенного вещества (рис. 3, *б*), а также ряд опытов (при постоянной $\overline{m}_A$) при различных значениях m_S (рис. 3, *а*). Это подтверждает высказанное ранее положение, что для получения полной характеристики аффинной системы всегда необходимы две серии экспериментов. Однако во многих исследованиях в качестве первичной задачи ставится лишь определе-

ние констант равновесия для взаимодействия растворенное вещество — лиганд; в связи с этим логично выяснить, не будет ли меньшее число экспериментов достаточным для такой частичной характеристики аффинной системы.

Изучение уравнений, приведенных в табл. 1, показывает, что при использовании предложенных графиков для анализа фронтальных экспериментов все выражения для определения тангенса угла наклона содержат полную концентрацию растворенного вещества $\bar{m}_A$ на прямолинейном участке графика (плато). Например, в рассматриваемой ситуации (пример 3) отношение наклон/отсекаемый отрезок дает $(1+K_{AX}\bar{m}_A)/K_{AS}$. Если принять, что $K_{AX}\bar{m}_A \ll 1$, то это отношение можно использовать для прямого измерения K_{AS}; такое допущение правомочно при достаточно низкой концентрации растворенного вещества [3, 6]. Однако выводы, получаемые при таких приближениях, нельзя принять безоговорочно из-за неопределенности значения K_{AX}, которое может быть гораздо больше, чем K_{AS}, даже в случае, когда иммобилизованный реагент и лиганд — близкие или идентичные вещества [18]. Например, применение допущения к результатам, представленным на рис. 3, *а*, привело бы к заключению, что для взаимодействия лизоцим — глюкоза $K_{AS}=3$ M^{-1}; если принять последнее значение для K_{AX}, т. е. для взаимодействия между ферментом и полиангидроглюкозной матрицей, то это дает, по-видимому, основания для пренебрежения членом $K_{AX}\bar{m}_A$ в экспериментах с $\bar{m}_A=8{,}3$ мкмоль/л. Однако исследования лизоцима в отсутствие глюкозы показывают, что K_{AX} не имеет ничего общего с K_{AS}; на самом деле $K_{AX}\bar{m}_A \approx 10$, что приводит к 10-кратному занижению K_{AS} при использовании описанных приближений.

Пренебрежение членом $K_{AX}\bar{m}_A$ применяется в анализе результатов фронтальной хроматографии методом Касаи и Ишии [4]. Оно также положено в основу метода анализа результатов зональной хроматографии [2, 3, 5], когда при неизвестной $\bar{m}_A$ единственной возможностью для анализа остается допущение, что $K_{AX}\bar{m}_A \ll 1$. Конечно, существует много систем, для которых K_{AS}, определенные методом приближенного анализа совпадали со значениями, установленными другими методами. Однако очевидно, что предпочтение следует отдать полному анализу, поскольку достоверность его результата не требует проверки другими методами.

5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫХ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Множественные взаимодействия растворенных веществ с участками связывания матрицы рассматривались лишь в четырех исследованиях по количественной аффинной хроматографии.

В одном из них [14] для интерпретации фосфорилхолинзависимого элюирования иммуноглобулина А с сефарозы, содержащей ковалентно связанный фосфорилхолин (иммобилизованный реагент X), был использован приближенный анализ [17] результатов зональной хроматографии. Другие исследования были посвящены фосфатзависимому элюированию альдолазы с фосфоцеллюлозы [18] и с миофибрилл мышц кролика [28] и NADH-зависимому элюированию лактатдегидрогеназы с 10-карбоксидециламино-сефарозы [32]. Все четыре системы относятся к примеру 3, включающему конкуренцию между S и X за положения связывания растворенного вещества.

5.1. Суммарная концентрация доступных положений

Существенным этапом исследований по количественной аффинной хроматографии, включая как моновалентные, так и мультивалентные растворенные вещества, является определение суммарной концентрации доступных положений связывания матрицы. На этой стадии были разработаны методики для количественного определения $\bar{\bar{m}}_X$, испытанные на системах, в которых А взаимодействует непосредственно с X (пример 3, но приемлемо также для примера 4). Однако ввиду отсутствия сообщений об исследованиях лигандзадерживаемого элюирования в системах с мультивалентным растворенным веществом, для этих систем не имеется экспериментально проверенных методик. Поэтому основное внимание уделяется главным образом методам измерения $\bar{\bar{m}}_X$ для систем, относящихся к примерам 3 и 4, после чего рассматривается возможное применение этих методов для анализа других ситуаций. Как и для соответствующих систем с моновалентным растворенным веществом, по степени взаимодействия растворенного вещества с аффинной матрицей в отсутствие лиганда вначале определяют $\bar{\bar{m}}_X$ и константу равновесия K_{AX} растворенное вещество — матрица. Для определения эффективной суммарной концентрации положений связывания матрицы $\bar{\bar{m}}_X$ были предложены три методики по измерению количества связавшегося растворенного вещества как функции концентрации последнего в жидкой фазе m_A; эта концентрация эквивалентна m_A, поскольку А — единственная растворимая форма в отсутствие лиганда.

5.2. Экстраполяция результатов к неопределенной концентрации растворенного вещества

Экстраполяция результатов к неопределенной концентрации растворенного вещества была первоначальным подходом [18] к решению проблемы определения $\bar{\bar{m}}_X$, основанным на том, что

при $\bar{m}_A \to \infty$ все доступные положения связывания матрицы становятся насыщенными в случае молекул одноточечно связанного растворенного вещества [27]. Так, в исследованиях по рециркулирующему распределительному равновесию системы фосфоцеллюлоза — альдолоза величина отсекаемого отрезка по оси ординат, полученная из графика, построенного в обратных координатах [т. е. $1/V_A^*(\bar{\bar{m}}_A - \bar{m}_A)$ от $1/\bar{m}_A$], была использована [18] для количественной оценки числа положений связывания

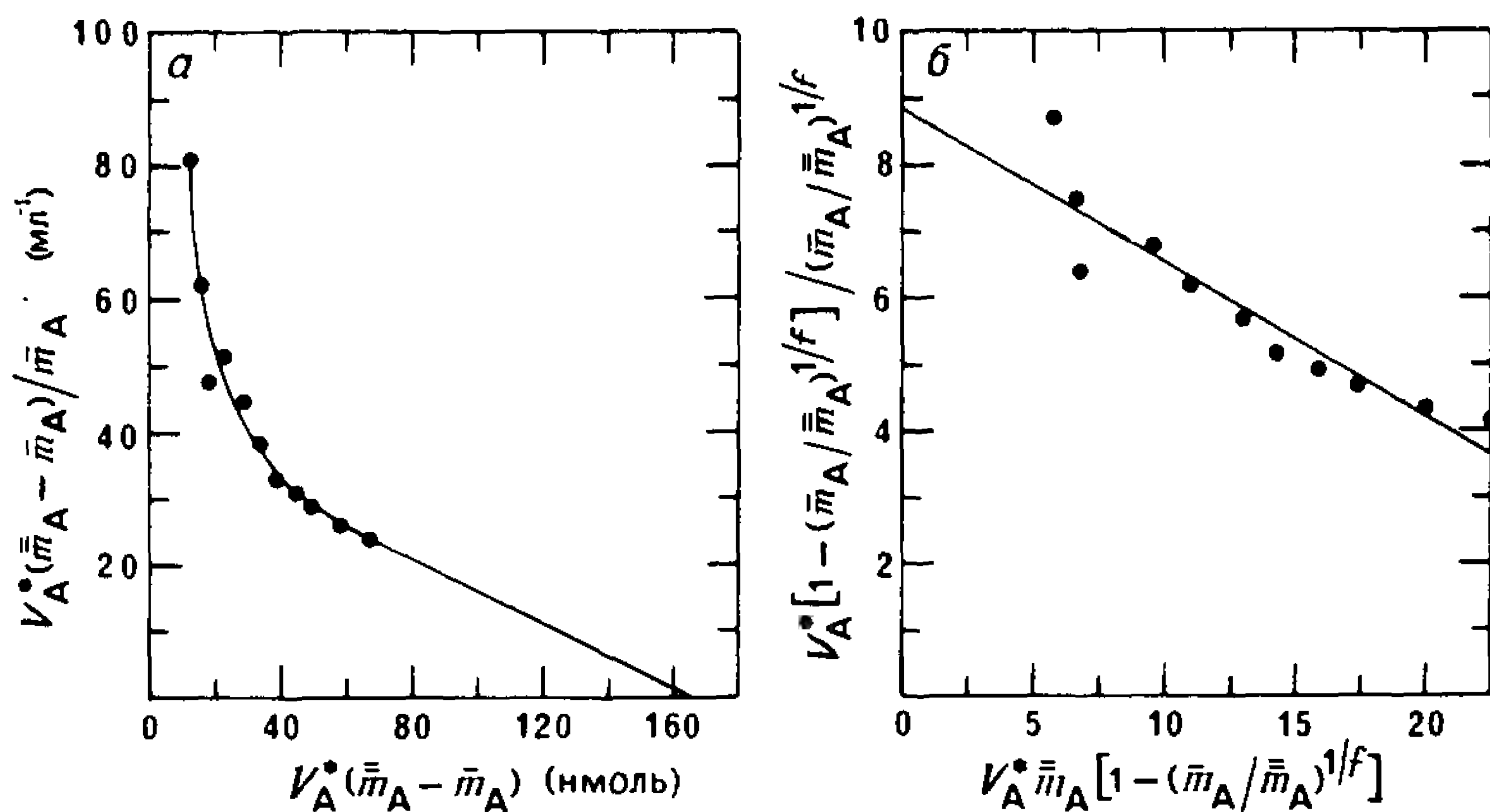


Рис. 4. Анализ результатов распределительного равновесия [18 (табл. 1)] для взаимодействия альдолазы с фосфоцеллюлозой. *а* — количественная оценка числа положений связывания матрицы ($V_A^* m_X$) для альдолазы в 0,783 г фосфоцеллюлозы экстраполяцией результатов к неопределенной концентрации фермента; *б* — зависимость, построенная с использованием уравнения (4) для одновременного определения k_{AX} и $V_A^*\bar{\bar{m}}_X$ с учетом тетравалентности альдолазы ($f=4$).

матрицы с помощью $V_A^*\bar{\bar{m}}_X$. По существу тот же метод был также применен для изучения распределительного равновесия при взаимодействии между альдолазой и миофибриллами мышц [28], за исключением того, что количество связанного фермента было выражено в виде функции $V_A^*(\bar{\bar{m}}_A - \bar{m}_A)/w_x$, где w_x — масса аффинной матрицы. Поскольку, как отмечено выше, $\bar{V}_A\bar{m}_A = V_A^*\bar{\bar{m}}_A$, вполне логично представить результаты фронтальной хроматографии в виде графика $1/\bar{m}_A(\bar{V}_A - V_A^*)$ от $1/\bar{m}_A$ и тогда на оси ординат отсекается отрезок, равный $1/V_A^*\bar{\bar{m}}_X$.

Как отмечено в первой публикации, посвященной рассматриваемому подходу [18], экстраполяция такого рода графиков в обратных координатах носит несколько неопределенный характер; гораздо нагляднее те же результаты представить в виде скатчардовской кривой [33] (рис. 4, *а*), для которой на оси абс-

Таблица 3. Определение констант связывания для взаимодействий альдолаза — фосфоцеллюлоза и альдолаза — фосфат методом аффинной хроматографии[а]

m_S, мМ	$\bar{\bar{m}}_A$, мкМ	$\bar{m}_A$, мкМ	$\bar{\bar{m}}_X$, мкМ	$k_{AX} \cdot 10^{-4}$, л/моль[а]	k_{AS}, л/моль[б]
—	1,33	0,25	11,60	5,32	—
—	2,08	0,46	11,36	5,24	—
—	3,15	0,89	11,02	4,89	—
—	4,27	1,44	10,67	4,72	—
—	5,83	2,28	10,18	4,98	—
—	6,78	2,80	9,88	5,48	—
1,00	0,113	0,069	3,09		180
1,00	0,224	0,143	3,07		280
1,00	0,335	0,221	3,06		360
1,00	0,662	0,443	3,02		340
1,00	0,769	0,509	3,01		270
1,00	0,875	0,593	3,00	5,1[в]	330
5,00	0,080	0,055	3,58		170
5,00	0,160	0,125	3,57		370
5,00	0,239	0,191	3,57		420
5,00	0,319	0,261	3,56		490
5,00	0,397	0,322	3,55		460
5,00	0,554	0,456	3,54		500

[а] Результаты из работы [18, табл. 1 и 2].
[б] Рассчитано по уравнению для примера 3 в табл. 2 (см. текст).
[в] Среднее значение k_{AX} по экспериментам с $m_S = 0$.

цисс отсекается отрезок, соответствующий сделанному ранее выводу [18], что для насыщения доступных положений связывания фосфоцеллюлозы необходимо 167 нмоль альдолазы. Несмотря на очевидную неопределенность такой экстраполяции, с помощью графика можно найти $\bar{\bar{m}}_X$, после чего k_{AX} может быть получена из любого эксперимента (путем измерения $\bar{m}_A$, $\bar{\bar{m}}_A$ или $\bar{m}_A$, $V_A^*/\bar{V}_A$) как единственный неизвестный параметр в уравнении, описывающем связывание тетравалентного фермента (табл. 2, пример 3 с $f=4$ и $m_S=0$). Некоторые результаты из работы [18] суммированы в табл. 3. Кроме того, значение $\bar{\bar{m}}_X$ можно уточнить, используя метод последовательных приближений при обработке k_{AX}.

5.3. Одновременное определение k_{AX} и $\bar{\bar{m}}_X$ графическими методами

Хотя описанный выше метод определения $\bar{\bar{m}}_X$ был применен в двух работах [18, 19], совершенно очевидно, что подобные экстраполяции лучше исключить. В недавнем повторном исследовании этой проблемы [22] для примера 3 предложено сле-

дующее преобразованное выражение:

$$\frac{[1-(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}}=\frac{k_{AX}\bar{\bar{m}}_X}{1+k_{AS}m_S}=\frac{fk_{AX}[1-(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}](\bar{V}_A/V^*_A)\bar{m}_A}{1+k_{AS}m_S} \quad (4)$$

Из уравнения (4) очевидно, что при данной валентности f растворенного вещества значение $\bar{\bar{m}}_X$ может быть в принципе получено из графика $[1-(V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}](V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}$ от $[1-(V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}](\bar{V}_A/V_A^*)\bar{m}_A$, как отношение наклона к отсекаемому отрезку; с этой целью ставится ряд экспериментов при одной и той же концентрации лиганда m_S, но рядом значений $\bar{m}_A$. Подобные результаты наиболее легко получить из экспериментов по распределительному равновесию в системе альдолаза — фосфоцеллюлоза [18], принимая во внимание, что $(V_A^*/\bar{V}_A)=(m_A/\bar{m}_A)$. На рис. 4, *б* приведен подобный график, причем вычисления по методу наименьших квадратов привели к следующему: $V_A^*\bar{\bar{m}}_X=154(\pm18)$ нмоль и $k_{AX}=5{,}8(\pm0{,}8)\cdot10^4$ М$^{-1}$. Следует отметить, что эти данные подтверждают данные, полученные ранее [18] с использованием метода экстраполяции: $V_A^*\bar{\bar{m}}_X=167$ нмоль (рис. 4, *а*) и $k_{AX}=5{,}1\cdot10^4$ М$^{-1}$ (табл. 3).

К естественному недостатку второго метода анализа относится, конечно, его зависимость от выбранного значения валентности f растворенного вещества. Хотя в приведенном выше примере установление числа активных положений в тетрамерной молекуле альдолазы не вызывает проблем, имеется, вероятно, много систем, для которых значение f также должно быть выведено на основе анализа результатов аффинной хроматографии. В этом отношении метод экстраполяции для получения $\bar{\bar{m}}_X$, несмотря на свойственную ему неопределенность, независим от f, и поэтому валентность f может быть в принципе установлена путем анализа экспериментальных данных (табл. 3) для ряда возможных f и выбора соответствующего значения, при котором k_{AX} сохраняется постоянным. Однако из-за неопределенности требуемой экстраполяции выше уже был предложен подход для уточнения значения $\bar{\bar{m}}_X$ при данном f. Возможно, что оптимальным подходом является совместное применение обоих методов.

Повторный анализ экспериментальных данных для системы альдолаза — фосфоцеллюлоза с помощью уравнения (4) при $f=2$ приводит к следующим значениям $V_A^*\bar{\bar{m}}_X=124(\pm15)$ нмоль и $k_{AX}=1{,}8(\pm0{,}5)\cdot10^5$ М$^{-1}$. Однако этот анализ менее приемлем с той точки зрения, что значение $V_A^*\bar{\bar{m}}_X$, рассчитанное подобным образом, не всегда согласуется с тем, которое получено методом экстраполяции, и не зависит от f (рис. 4, *а*). Кроме того, относительная ошибка, связанная с определением k_{AX}, составляет 30%, т. е. в 2 раза больше, чем при нахождении k_{AX} по рис. 4, *б*

при $f=4$; эти данные также свидетельствуют в пользу более высокого значения валентности растворенного вещества. Действительно, метод оценки параметров путем минимизации стандартных ошибок позволяет предложить третий путь определения $\bar{\bar{m}}_X$ и k_{AX}.

5.4. Определение $\bar{\bar{m}}_X$ и k_{AX} методом минимизации стандартных ошибок

Третий метод определения $\bar{\bar{m}}_X$ был предложен[32] для анализа данных фронтальной хроматографии [20], основанной на взаимодействии лактатдегидрогеназы с 10-карбоксидециламино-сефарозой. Для получения $\bar{\bar{m}}_X$ исследования при нескольких концентрациях фермента в этой системе [20] оказались недостаточными для точного установления величины отрезка, отсекаемого на оси ординат, на графике в обратных координатах (рис. 5, *а*) [18]. Однако для определения k_{AX} по каждой из шести экспериментальных точек для ряда значений $\bar{\bar{m}}_X$ может

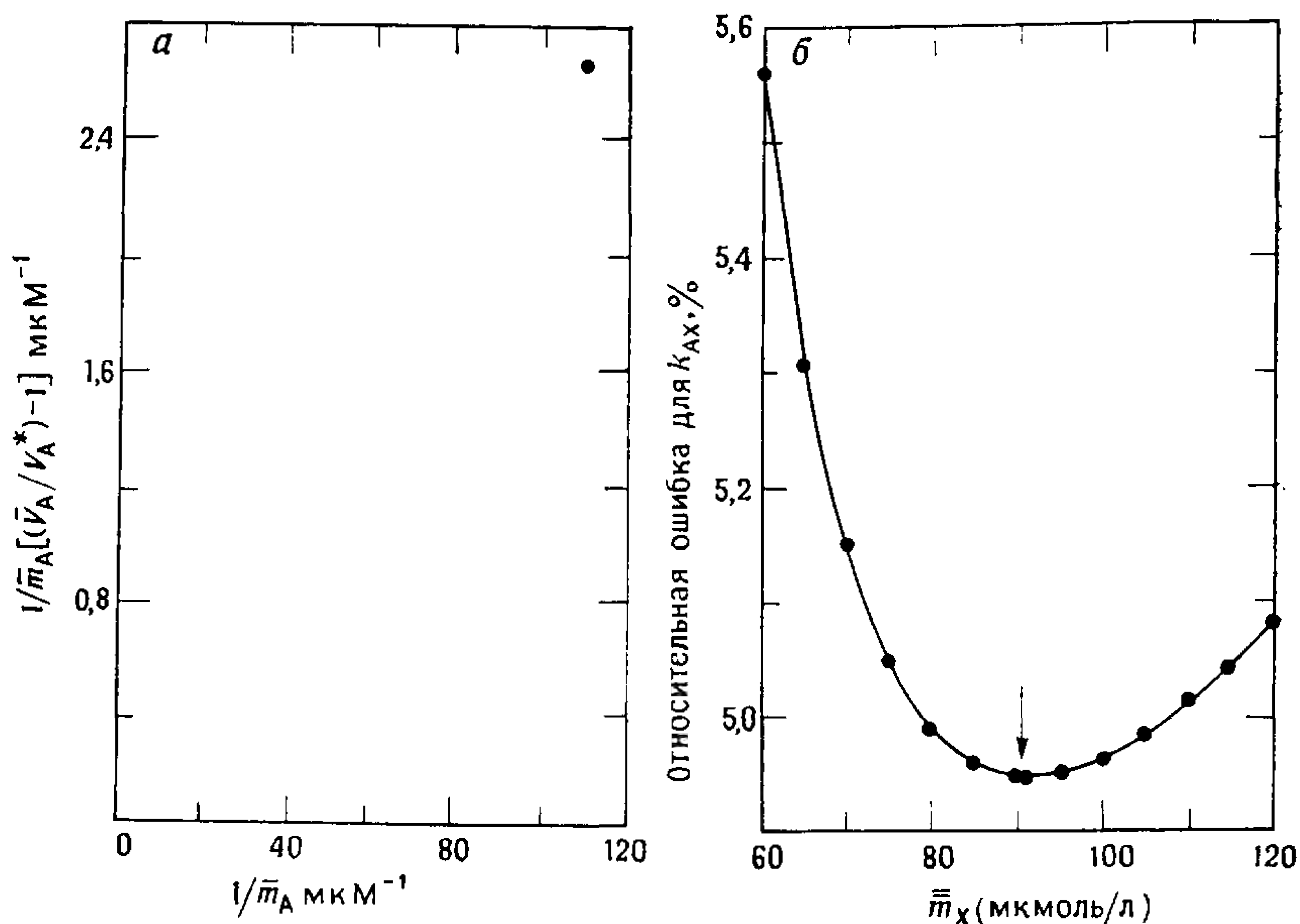


Рис. 5. Определение концентрации доступных положений связывания матрицы ($\bar{\bar{m}}_X$) из данных по изучению взаимодействий лактатдегидрогеназы печени крысы с 10-карбоксидециламино-сефарозой методом фронтальной хроматографии [20]. *а* — график в обратных координатах [20, рис. 2] для определения $\bar{\bar{m}}_X$ как обратной величины отсекаемого отрезка на оси ординат [18]; *б* — определение $\bar{\bar{m}}_X$ по тем же данным методом, основанным на минимизации относительной ошибки k_{AX}, рассчитанных при заданных значениях $\bar{\bar{m}}_X$ [32].

быть использовано соответствующее уравнение из табл. 2 (пример 3, $m_S=0$), после чего определяют значение, дающее наименьшую стандартную ошибку для средней величины k_{AX}. Для случая, изображенного на рис. 5, б, при $f=4$ было получено $\bar{\bar{m}}_X=91$ мкмоль/л и $k_{AX}=1{,}8\cdot10^4$ М$^{-1}$; при $f=2\bar{\bar{m}}_X=46$ мкмоль/л, но степень относительной ошибки в k_{AX} (6,8%) была больше, что указывает на лучшее соответствие результатов при рассмотрении распределяющего фермента как тетравалентного вещества ($f=4$). Таким образом, методика, основанная на минимизации ошибок, также открывает возможности количественной оценки результатов аффинной хроматографии для получения достоверного значения $\bar{\bar{m}}_X$.

5.5. Системы с лигандзадерживаемым элюированием растворенного вещества

Одним из возможных методов для определения $\bar{\bar{m}}_X$ в указанных системах является фактически описанная выше вторая методика, примененная к данным, полученным для ряда значений $\bar{m}_A$ в присутствии определенной концентрации лиганда m_S; путем соответствующих преобразований уравнений, приведенных в табл. 2, можно получить

$$\frac{[1-(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}]}{(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}}=\frac{k_B m_S k_T \bar{\bar{m}}_X}{1+k_B m_S}-$$
$$-\frac{f k_B m_S k_T\,[1-(V^*_A/\bar{V}_A)^{1/f}]\,(\bar{V}_A/V^*_A)\,\bar{m}_A}{1+k_B m_S} \qquad (5)$$

где k_B и k_T — соответствующие константы равновесия для образования двойных и тройных комплексов, аналогичные рассмотренным выше для моновалентных растворенных веществ. Независимо от выбора m_S отношение тангенса угла наклона к величине отсекаемого отрезка графика $[1-(V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}]/(V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}$ от $[1-(V_A^*/\bar{V}_A)^{1/f}](\bar{V}_A/V_A^*)\bar{m}_A$ дает возможность определения $\bar{\bar{m}}_X$. Кроме того, если концентрация лиганда достаточно высока, т. е. $k_B m_S \gg 1$, то значение истинной константы ассоциации образования тройного комплекса может быть получено по тангенсу угла наклона графика. Как было отмечено в случае моновалентных веществ, условие ($k_B m_S \gg 1$) делает выражение для лигандзадерживаемой аффинной хроматографии в присутствии лиганда формально идентичным с выражением для лигандускоряемого элюирования в отсутствие лиганда (табл. 2), причем единственным отличием является замена константы тройного равновесия (k_{ASX} или k_{XSA}) на константу двойного равновесия k_{AX}. Таким образом, все три описанных выше метода в принципе применимы к результатам, полученным для лигандзадерживаемых аффинных систем в присутствии насыщающей концен-

трации лиганда. Как отмечалось ранее, экспериментальные исследования, подтверждающие это заключение, в настоящее время отсутствуют.

5.6. Определение второй константы равновесия

Из четырех параметров, значения которых выводятся в количественной аффинной хроматографии (f, $\bar{\bar{m}}_X$ и две константы равновесия), валентность растворенного вещества и одна константа равновесия устанавливаются в ходе определения $\bar{\bar{m}}_X$. Следовательно, остается единственная проблема определения значения другой истинной константы ассоциации, что представляет собой относительно простую задачу. Независимо от рассматриваемого конкретного случая (примеры 1—4) необходимые экспериментальные данные должны включать $(V_A^*/\bar{V}_A)$ или $(\bar{m}_A/\bar{\bar{m}}_A)$ для реакционных смесей, содержащих различные концентрации лиганда m_S. При фронтальной хроматографии, например, можно ограничиться определением $\bar{V}_A$ как функции m_S в экспериментах с определенным значением $\bar{m}_A$ [20, 32], в то время как при использовании методики рециркулирующего распределительного равновесия [18] более удобно исследовать ряд концентраций растворенного вещества при нескольких концентрациях лиганда. В табл. 3 приведены некоторые результаты для системы альдолаза — фосфоцеллюлоза в присутствии фосфата [18], а также значение k_{AS} для каждого эксперимента, полученное с применением уравнения из табл. 2 (пример 3). На основании данных табл. 3 можно заключить [18], что фосфатзависимое элюирование альдолазы мышц кролика с фосфоцеллюлозы отражает конкуренцию между фосфатом и связывающими положениями матрицы за четыре эквивалентных и независимых положения альдолазы, причем при pH 7,4 и $I=0{,}15$ $k_{AX}=5{,}1\cdot10^4$ M^{-1} и $k_{AS}=350$ M^{-1}.

6. ЗНАЧЕНИЕ КОНСТАНТ РАВНОВЕСИЯ ДЛЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С МАТРИЦЕЙ

При обсуждении результатов изучения систем фосфоцеллюлоза — альдолаза — фосфат отмечалось, что хотя k_{AS} описывает взаимодействие альдолазы с фосфатом в обычных терминах для раствора, константа ассоциации фермент — матрица определяется в некоторой степени ограниченностью объема, выбранного для определения $\bar{\bar{m}}_X$, т. е. объема, доступного для растворенного вещества. Несмотря на отчасти эмпирический характер, k_{AX} тем не менее удовлетворяет термодинамическому представлению об определении распределения фермента в растворимой и иммобилизованной формах в любой реакционной смеси, для которой

концентрация доступных связывающих положений матрицы $\bar{\bar{m}}_X$ и полная концентрация растворенного вещества $\bar{\bar{m}}_A$ определяются в той же объемной шкале, что и k_{AX}. Это важно учитывать при исследованиях природных аффинных систем, таких, как метаболитзависимое распределение альдолазы в мышцах [28]. Однако если целью исследования по количественной аффинной хроматографии является определение константы связывания для взаимодействия растворенное вещество — лиганд, то очевидно, что k_{AX} для связывания растворенного вещества с иммобилизованным на матрице лигандом не должно рассматриваться в качестве константы равновесия соответствующего взаимодействия между растворенным веществом и лигандом в растворе; это связано не только с зависимостью k_{AX} от некоторого эмпирически ограниченного объема при определениях $\bar{\bar{m}}_X$ и $\bar{\bar{m}}_A$, но также и с фундаментальными различиями двух взаимодействий из-за стерических эффектов и последствий химической модификации при иммобилизации лиганда. Следовательно, константа равновесия для взаимодействия растворенное вещество — лиганд могла бы, вероятно, быть определена как k_{AS} по экспериментам, в которых растворимая и иммобилизованная формы одного и того же лиганда конкурируют за растворенное вещество; этот метод был применен в работе [14] для исследования взаимодействия между иммуноглобулином А и фосфорилхолином.

7. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

На протяжении последнего десятилетия мы стали свидетелями появления количественной аффинной хроматографии как метода изучения взаимодействий между различными реагирующими веществами. Этот еще относительно молодой метод вызывает несомненный интерес, поскольку в некоторых случаях дает возможность на основе специфического взаимодействия с иммобилизованным реагентом количественно оценивать обратимую реакцию, протекающую в биологических условиях, что продемонстрировано на примере использования оксамат-сефарозы для изучения взаимодействия NADH с различными изоферментными формами лактатдегидрогеназы в неочищенном тканевом экстракте [6]. Другим преимуществом аффинной хроматографии, вероятно, является отсутствие каких-либо ограничений для значений констант равновесия, которые могут быть измерены этим методом. Из двух рассмотренных здесь подробно примеров очевидно, что количественная аффинная хроматография весьма удобна для характеристики относительно слабых взаимодействий ($k_{AS} < 1000\ M^{-1}$), оценка которых вызывает затруднения при использовании других методов, таких, как равновесный диализ, из-за сложности измерения различий между полной и свободной

концентрациями лиганда. В то же время показано, что количественная аффинная хроматография также пригодна для оценки взаимодействий, характеризующихся константами равновесия, расположенными на другом конце диапазона значений; это взаимодействия с большими значениями k_{AS}, при которых требуемые для их изучения концентрации лиганда слишком малы для экспериментального определения и количественного измерения в реакционной смеси. Предварительный тщательный диализ растворенного вещества против ряда растворов лиганда с определенной концентрацией, полученных разбавлением раствора с экспериментально определяемой концентрацией, дает возможность определить $\bar{V}_A$ как функцию m_S и таким образом получить k_{AS}.

Хотя представления, положенные в основу этого обзора, несомненно, пригодны для изучения большого числа взаимодействий, их ни в коем случае нельзя считать подходящими абсолютно для всех систем. Например, ситуация, когда может происходить взаимодействие как А, так и его комплекса с лигандом и матрицей (k_{AX} и k_{ASX} — истинные константы), не рассматривалась в настоящем обзоре; для этой ситуации предложена более сложная теория [19]. Однако, допуская, что единственная истинная константа ассоциации описывает все взаимодействия особого типа между растворенным веществом и матрицей, мы существенно ограничиваем область применения современных методик в количественной аффинной хроматографии с мультивалентными растворенными веществами [18, 19]. Нетрудно представить себе, что последовательные взаимодействия растворенного вещества с матрицей могут характеризоваться увеличением или уменьшением констант связывания ввиду изменения стерических факторов, связанных с расположением иммобилизованных групп X. Другой, уже обсуждавшийся аспект, ограничивающий применение настоящих методик, связан с допущением идентичности характеристик распределения в геле растворенного вещества и всех комплексов растворенное вещество — лиганд. Кроме того, совершенно не принимались во внимание кинетические соображения (химических процессов и массопередачи), касающиеся процесса распределения. В этом отношении более общая теория количественной аффинной хроматографии [34] показала, что ограничение значений констант скорости, вызванное предполагаемым достижением распределительного равновесия, вероятно, не имеет значения для исследований обычной колоночной хроматографии, но может сделать невозможным применение представленных выше выражений к результатам, полученным при высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием бóльших скоростей потока. Как отмечено в работе [35], возможное использование аффинной хроматографии для количественных исследований связывания лиганда, несом-

ненно требует дальнейшего как теоретического, так и экспериментального изучения. Однако проведенные до сих пор исследования свидетельствуют о том, что количественная аффинная хроматография может рассматриваться как один из наиболее универсальных методов для изучения взаимодействий между лигандами и макромолекулами.

Литература

1. *Andrews P., Kitchen B. J., Winzor D. J.*, Biochem. J., **135**, 897 (1973).
2. *Dunn B. M., Chaiken I. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **71**, 2382 (1974).
3. *Nichol L. W., Ogston A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H.*, Biochem. J., **143**, 435 (1974).
4. *Kasai K., Ishii S.*, J. Biochem. (Tokyo), **77**, 261 (1975).
5. *Dunn B. M., Chaiken I. M.*, Biochemistry (Wash.), **14**, 2343 (1975).
6. *Brinkworth R. I., Masters C. J., Winzor D. J.*, Biochem. J., **151**, 631 (1975).
7. *Chaiken I. M., Taylor H. C.*, J. Biol. Chem., **251**, 2044 (1976).
8. *Taylor H. C., Chaiken I. M.*, J. Biol. Chem., **252**, 6991 (1977).
9. *Kasai K., Ishii S.*, J. Biochem. (Tokyo), **84**, 1051 (1978).
10. *Danner J., Sommerville J. E., Turner J., Dunn B. M.*, Biochemistry (Wash.), **18**, 3039 (1979).
11. *Dunn B. M., Gilbert W. A.*, Arch. Biochem. Biophys., **198**, 533 (1979).
12. *Oda Y., Kasai K., Ishii S.*, J. Biochem. (Tokyo), **89**, 285 (1981).
13. *Veronese F. M., Vevilacqua R., Chaiken I. M.*, Mol. Pharmacol., **15**, 313 (1979).
14. *Eilat D., Chaiken I. M.*, Biochemistry (Wash.), **18**, 790 (1979).
15. *Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I.*, J. Biochem. (Tokyo), **90**, 1799 (1981).
16. *Kálmán M., Boross L.*, Biochim. Biophys. Acta, **704**, 272 (1982).
17. *Chaiken I. M., Eilat D., McCormick W. M.*, Biochemistry (Wash.), **18**, 794 (1979).
18. *Nichol L. W., Ward D., Winzor D. J.*, Biochemistry (Wash.), **20**, 4856 (1981).
19. *Winzor D. J., Ward L. D., Nichol L. W.*, J. Theor. Biol., **98**, 171 (1982).
20. *Kyprianou P., Yon R. J.*, Biochem. J., **207**, 549 (1982).
21. *Winzor D. J.*, in: Protein-Protein Interaction, Frieden C., Nichol L. W. (eds.), Wiley, New York, 1981, p. 129.
22. *Hogg P. J., Winzor D. J.*, Arch. Biochem. Biophys., in press (1984).
23. *Klotz I. M.*, Arch. Biochem., **9**, 109 (1946).
24. *Nichol L. W., Winzor D. J.*, in: Protein-Protein Interactions, Frieden C., Nichol L. W. (eds.), Wiley, New York, 1981, p. 337.
25. *Flory P. J.*, J. Am. Chem. Soc., **63**, 3083 (1941).
26. *Singer S. J.*, in: The Proteins, Vol. 3, Neurath H. (ed.), Academic Press, New York, 1965, p. 269.
27. *Calvert P. D., Nichol L. W., Sawyer W. H.*, J. Theor. Biol., **80**, 233 (1979).
28. *Kuter M. R., Masters C. J., Winzor D. J.*, Arch. Biochem. Biophys., **225**, 384 (1983).
29. *Longsworth L. G.*, J. Am. Chem. Soc., **65**, 1755 (1943).
30. *Laurent T. C., Killander J.*, J. Chromatogr., **14**, 317 (1964).
31. *Ford C. L., Winzor D. J.*, Anal. Biochem., **114**, 146 (1981).
32. *Winzor D. J., Yon R. J.*, Biochem. J., **217**, 867 (1984).
33. *Scatchard G.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 660 (1949).
34. *Hethcote H. W., De Lisi C.*, J. Chromatogr., **248**, 183 (1982).
35. *Chaiken I. M.*, Anal. Biochem., **97**, 1 (1979).

Глава 7.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С ЗОНАЛЬНЫМ ЭЛЮИРОВАНИЕМ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Д. Аберкромби, И. Чейкен (D. M. Abercrombie, I. M. Chaiken)

1. ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействия небольших молекул, макромолекул и мультимолекулярных систем можно оценить с помощью параметров элюирования этих веществ с аффинных матриц, содержащих иммобилизованные взаимодействующие компоненты. Общей задачей в аффинной хроматографии является получение иммобилизованного лиганда, сохраняющего способность биоспецифически связывать вещество, находящееся в подвижной фазе, чаще всего белок или другую макромолекулу (рис. 1). На такой специфичности основаны эффективные методы препаративного выделения требуемых компонентов из сложных смесей, которые могут содержать примеси, близкие по другим свойствам, часто используемым для очистки, таким, как размер и небиоспецифические характеристики поверхности. Аффинная хроматография служит не только методом препаративного выделения, но может быть и гибким аналитическим методом, так как степень хроматографического удерживания подвижного реагирующего вещества на иммобилизованном лиганде позволяет определять равновесную константу связывания для взаимодействия аффинной матрицы с подвижным компонентом [1, 2]. Кроме того, если в ходе зонального элюирования в подвижную фазу включаются вещества, влияющие на связывание с аффинной матрицей путем прямого взаимодействия с элюируемым подвижным компонентом (например, вследствие конкуренции с иммобилизованным компонентом), то могут быть измерены также параметры взаимодействия таких эффекторов. И поскольку для данной аффинной матрицы можно варьировать конкурирующие вещества и другие эффекторы, а также химическую природу подвижного аффинанта, то могут быть определены специфичность связывания и его зависимость от pH раствора, состава буфера и температуры. В заключение, когда константы связывания для иммобилизованного лиганда можно сравнить с таковыми для растворимого аналога, сопоставление взаимодействий в случае аффинной матрицы и раствора может быть использовано для конструирования и оценки аффинных матриц в качестве препаратив-

ных инструментов, что способствует правильному выбору матрицы как компонента биоспецифического взаимодействия.

Методика зонального элюирования в аналитической аффинной хроматографии была разработана фактически параллельно с методикой постоянного элюирования/фронтального анализа (гл. 6). Благодаря прежде всего экспериментальной простоте, зональный метод нашел широкое применение для биохимического анализа биомолекулярных взаимодействий, при которых одно из реагирующих веществ может быть иммобилизовано с сохранением способности биоспецифического связывания. Поскольку метод может быть использован для анализа очень небольших количеств подвижного компонента, он имеет важное значение

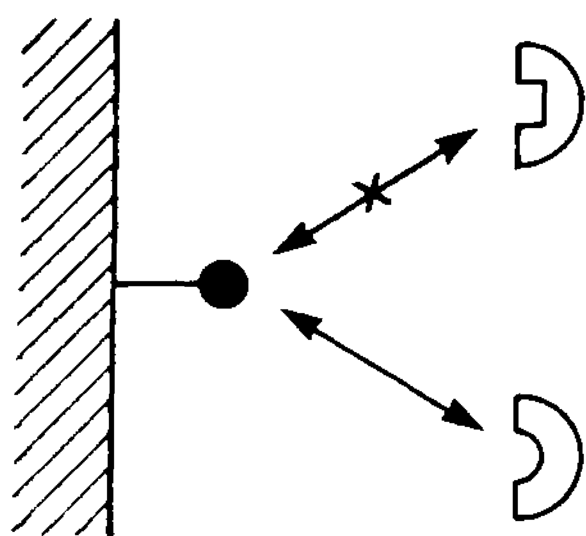


Рис. 1. Схематическое изображение различия в узнавании биоспецифического компонента подвижной фазы поверхностью аффинной матрицы. Аффинная матрица с такого рода биоспецифичностью может быть использована для аналитического изучения количественных параметров взаимодействия между подвижными и иммобилизованными компонентами и между ними и подвижными эффекторами.

как микрометод для биохимического анализа многих биологически активных веществ, доступных только в небольших количествах (например, иммунореактивные или радиоактивно меченные вещества).

Ниже рассмотрены основные экспериментальные особенности и подходы аналитической аффинной хроматографии с зональным элюированием. Обсуждаются свойства аффинной матрицы и растворенного реагирующего вещества в отношении их применимости для аналитических (в отличие от препаративных) экспериментов. В заключение представлены примеры, показывающие возможности рассматриваемого метода для изучения нескольких систем, относящихся к взаимодействию белок — лиганд и белок — белок.

2. ЗОНАЛЬНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ниже приведено описание общей методики аффинной хроматографии взаимодействующего растворенного компонента на матрице с иммобилизованным биоспецифическим лигандом при зональном элюировании.

1) На колонку наносят зону небольшого объема, содержащую подвижный компонент; колонку предварительно уравнове-

шивают соответствующим буфером, содержащим или не содержащим эффектор.

2) Элюирование продолжают уравновешивающим буфером (+/— эффектор).

3) Определяют кривую элюирования первоначально введенного подвижного компонента.

Типы взаимодействий, которые могут иметь место в процессе аффинной хроматографии, если эффектор является конкурентным лигандом, показаны на рис. 2; типичные результаты представлены на рис. 3.

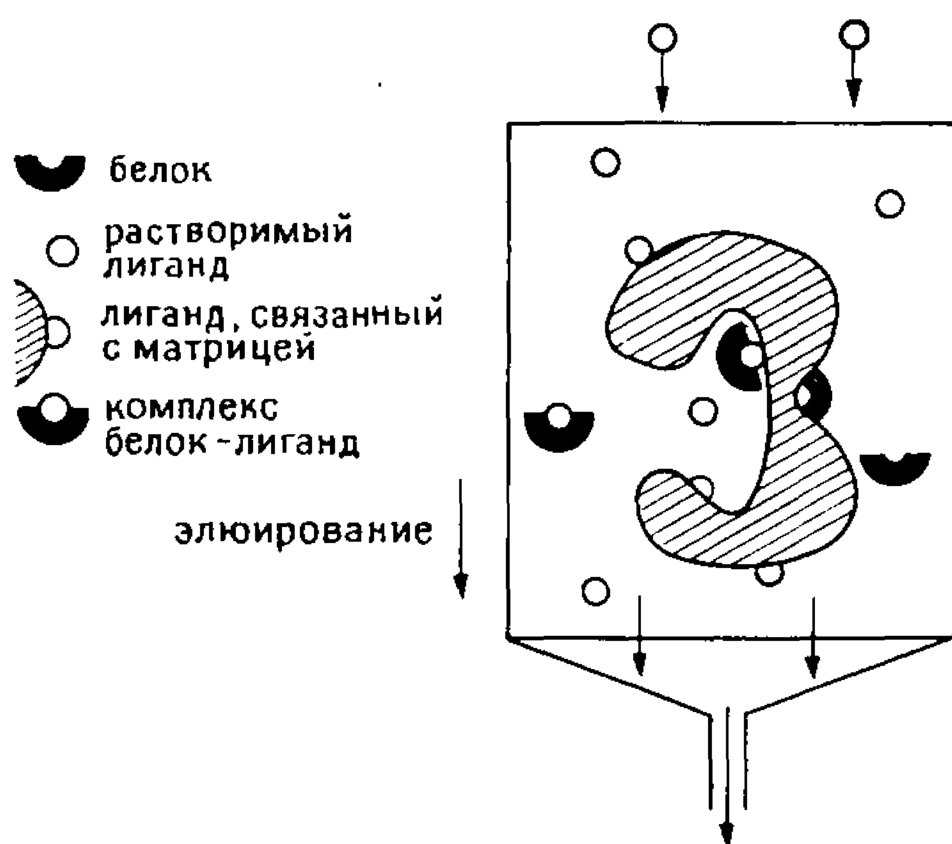


Рис. 2. Схематическая диаграмма аффинной хроматографии с конкурентным зональным элюированием, изображающая взаимодействия подвижных и иммобилизованных компонентов. В приведенном примере элюирующий буфер содержит растворимый лиганд, конкурирующий с иммобилизованным лигандом за связывание с тем же активным положением подвижного компонента (в данном случае белка) [3].

Ниже рассмотрены общие методологические особенности аффинной хроматографии с зональным элюированием.

1) Зональное элюирование обычно проводят на небольших колонках объемом, как правило, 1—10 мл с узким внутренним диаметром (7—10 мм).

2) После упаковки адсорбента колонку уравновешивают буфером, используемым для хроматографического элюирования. Температура процесса зависит главным образом от стабильности компонентов биоспецифической системы и природы нековалентных взаимодействий между подвижным и иммобилизованным компонентами.

3) В оптимальных условиях ряд физических параметров колонки, например скорость потока V_0 (объем элюирования не взаимодействующего, проникающего в поры адсорбента вещества, размер молекул которого близок таковому для растворенно-

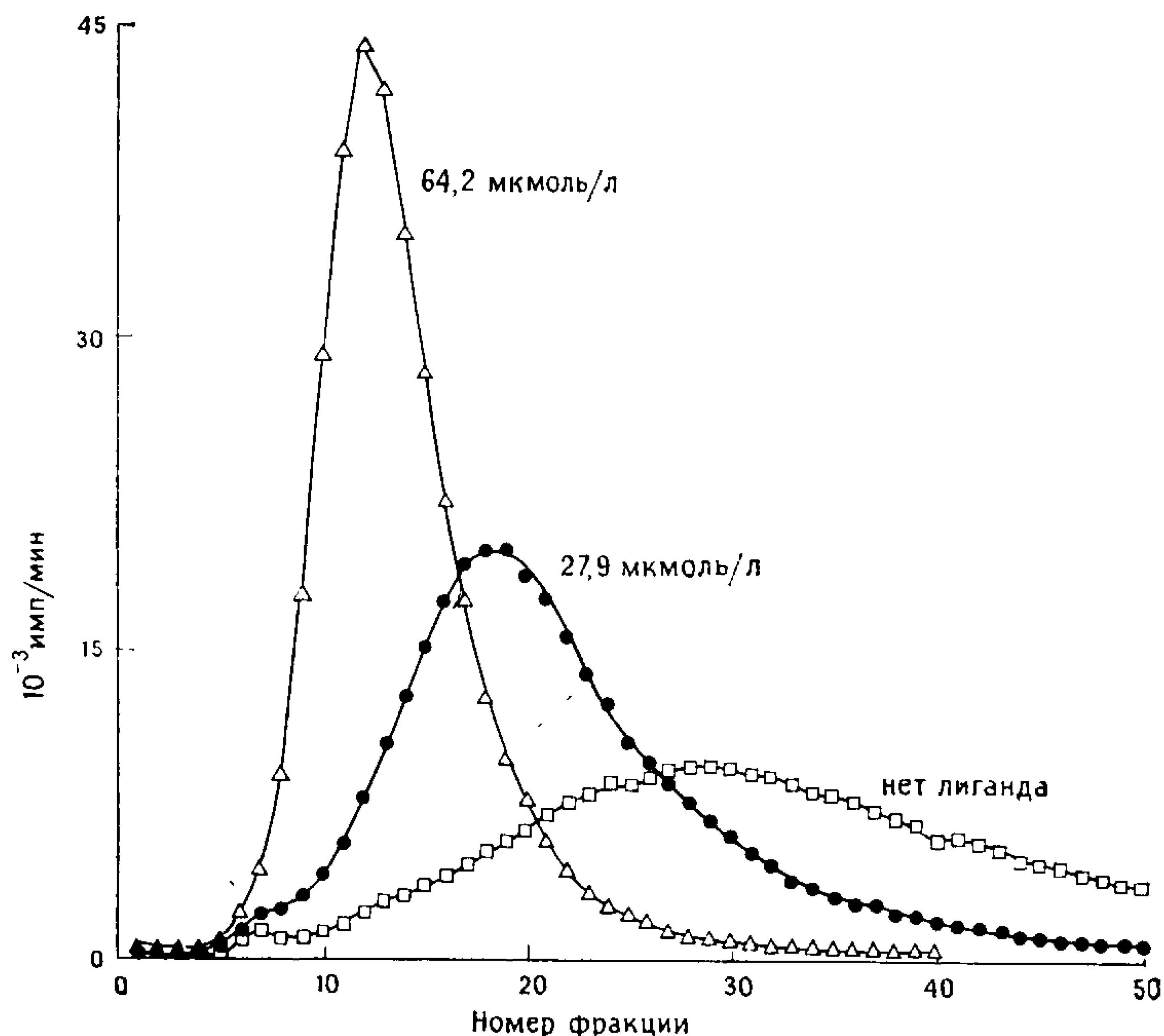


Рис. 3. Примеры кривых конкурентного зонального элюирования в ряде экспериментов с системой нейрофизин — пептид, показывающих хроматографическое поведение зон белка, элюированных с иммобилизованного лиганда увеличивающимися количествами конкурентного лиганда в элюирующем буфере. Зоны (каждая по 100 мкл на 2 мл адсорбента) [^{125}I]-меченного бычьего нейрофизина II элюировали с Met-Tyr-Phe-аминобутил-агарозы 0,4 М ацетатом аммония (pH 5,7), содержащим конкурентный лиганд лизинвазопрессин при различных концентрациях. Увеличение концентрации растворенного конкурирующего лиганда приводит к пропорциональному уменьшению объемов элюирования меченого белка [4].

го компонента взамодействующей системы) и V_m (исключающийся объем), остается постоянным для серии экспериментов с зональным элюированием. Это дает возможность сравнивать результаты большого количества хроматографических анализов и исключает необходимость повторного определения V_0 и V_m. Как правило, элюирование в небольших аналитических колонках осуществляют гравитационным методом; таким образом, скорость потока определяется гидростатическим давлением в колонке. Приемлемые скорости потока составляют 20—60 мл/ч.

4) V_0 и V_m зависят от объема матрицы в колонке, однако при определении этих параметров обычно включают также объем внутри трубок, соединяющих колонку с коллектором фракций или с детектором, если он расположен между колонкой и коллектором. После определения V_0 и V_m для данной системы

не следует менять физическую форму колонки, объем емкостей буферов, заменять инжектор для введения образца, соединительную трубку, детектор и коллектор фракций.

5) Полный объем колонки V_0 определяют при элюировании вещества, молекулы которого достаточно небольшие по размеру и проникают в гель в той же степени, что и молекулы подвижного компонента; однако это вещество не должно проявлять специфического сродства к иммобилизованному лиганду. Для анализов взаимодействий небольших белков на аффинных сорбентах на основе агарозы, аналогичных описанным ниже, для определения V_0 была использована панкреатическая рибонуклеаза быка или другой подобный белок.

6) Исключающийся объем колонки V_m определяют при элюировании больших, не проникающих в гель молекул; для сорбентов на основе агарозы часто использовали голубой декстран.

7) Небиоспецифические взаимодействия (например, образование ионной пары между подвижным компонентом и матрицей), приводящие к нежелательному дополнительному удерживанию, должны быть исключены соответствующим выбором буфера и условий проведения эксперимента [5]. Природа неспецифического взаимодействия определяет в конечном счете условия, необходимые для его исключения.

8) На колонку обычно вводят образец в небольшом объеме, как правило, $<$100—400 мкл для колонок с объемом адсорбента 1—10 мл.

9) Содержание белка в зоне, введенной в колонку, должно быть минимальным (разд. 3.1). Для проведения анализов с зональным элюированием, когда работают с очень небольшими количествами подвижного компонента, преимущественно используют чувствительные методы детектирования, такие, как определение радиоактивности, радиоиммунный и ферментативный анализ.

10) Объемы элюирования могут быть определены визуально методом триангулирования основного пика. В случае когда несвязавшиеся примеси элюируются с полным объемом колонки V_0 и определяются с помощью подходящего метода, полученный пик обычно не учитывают, если он не влияет на анализ задерживаемого пика подвижного компонента биоспецифической системы (объем элюирования близок V_0). Компьютерная обработка данных элюирования для определения объемов элюирования является надежной альтернативой метода триангулирования.

3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИВЫХ ЭЛЮИРОВАНИЯ ДЛЯ РАСЧЕТА КОНСТАНТ РАВНОВЕСИЯ

3.1. Моновалентные системы

Запишем реакции конкурентного моновалентного связывания (рис. 2)



$$P + L \overset{K_L}{\rightleftarrows} PL \qquad P + \bar{L} \overset{K_{\bar{L}}}{\rightleftarrows} P\bar{L} \qquad (1)$$

где P — подвижный компонент, $\bar{L}$ — лиганд, иммобилизованный на матрице, L — растворимый компонент, конкурирующий с $\bar{L}$ за связывание с P; PL и P$\bar{L}$ — нековалентные комплексы между соответственно подвижными и иммобилизованными компонентами системы; K_L и $K_{\bar{L}}$ — константы диссоциации для PL и P$\bar{L}$. В настоящем обсуждении, как правило, P — макромолекула (например, белок), а L и $\bar{L}$ — низкомолекулярные лиганды, связывающиеся с одним и тем же активным центром P. Тем не менее обсуждаемые уравнения также пригодны и для других случаев, например когда и P и $\bar{L}$ — макромолекулы.

Основываясь на уравнениях (1) и учитывая общие положения жидкостной хроматографии с взаимодействующими компонентами [1, 2, 6], можно вывести зависимость:

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{K_{\bar{L}}}{(V_0 - V_m)[\bar{L}]} + \frac{K_{\bar{L}}[L]}{K_L (V_0 - V_m)[\bar{L}]} \qquad (2)$$

Это выражение устанавливает связь между изменением экспериментально измеренного объема элюирования подвижного компонента и концентрациями иммобилизованного и растворимого конкурирующих лигандов [$\bar{L}$] и [L], а также константами диссоциации $K_{L'}$ и K_L. Для систем с моновалентным взаимодействием с помощью уравнения (2) можно определить $K_{\bar{L}}$ и K_L непосредственно по хроматографическим данным. Для специфической аффинной матрицы с фиксированной концентрацией иммобилизованного лиганда [$\bar{L}$] проводится ряд экспериментов с изменяющимися значениями [L] в элюирующем буфере. Объемы элюирования зон подвижной макромолекулы определяются при различных значениях [L]. Строят зависимость $1/(V - V_0)$ от [L]. Тогда $K_{\bar{L}}$ можно найти по тангенсу угла наклона прямой, а K_L — по отсекаемому отрезку на оси ординат. K_L и $K_{\bar{L}}$ можно рассчитать также аналитически, обработав полученные данные по элюированию линейным методом наименьших квадратов.

$[\bar{L}]$ (разд. 4.2), V_0 и V_m определяются для данной матрицы и физических параметров колонок.

В некоторых случаях может быть желательно или необходимо проводить зональное элюирование в отсутствие конкурирующего растворимого лиганда ($[L]=0$). В этом случае уравнение (2) упрощается:

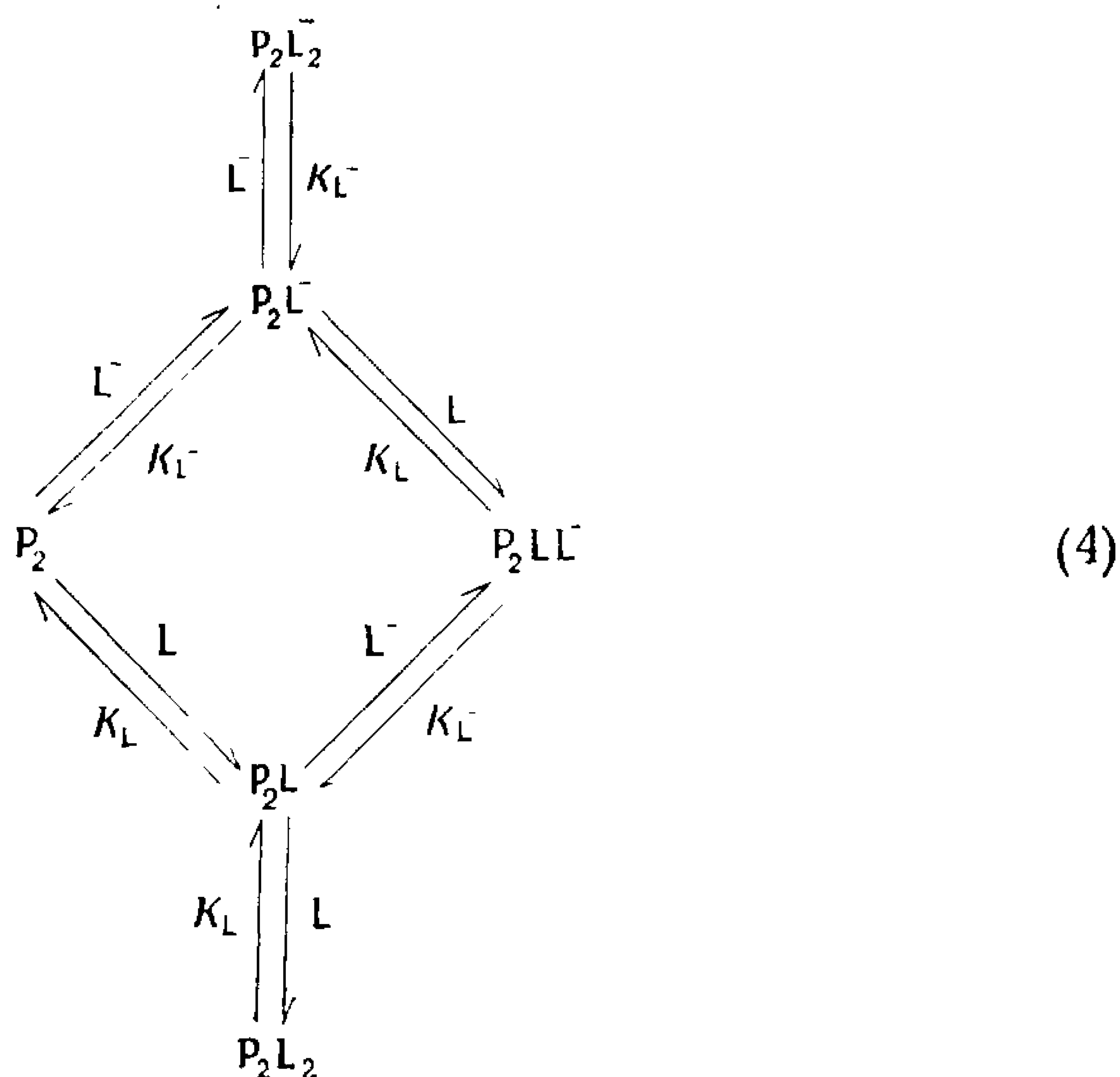
$$\frac{1}{V-V_0}=\frac{K_{\bar{L}}}{(V_0-V_m)[\bar{L}]} \qquad (3)$$

В отсутствие конкурирующего лиганда $[L]=0$, тогда $K_{\bar{L}}$ пропорциональна $1/(V-V_0)$. Таким образом, для матрицы с постоянным значением $[\bar{L}]$, использованной для конкурентного зонального элюирования, $K_{\bar{L}}$ можно достаточно надежно найти по одной кривой элюирования.

Важное условие зональной аналитической аффинной хроматографии состоит в том, что концентрация подвижного компонента [P] по мере прохождения зоны через слой адсорбента постоянно изменяется. Поэтому члены, содержащие [P], не включаются в выражения, относящиеся к объемам элюирования и константам диссоциации (см., например, приведенные выше уравнения). Пренебрежение [P] допустимо только в том случае, если этот параметр мал по сравнению с константой диссоциации K_L. Проведение экспериментов по зональному элюированию при низком [P] обычно легко осуществимо и особенно желательно при анализе труднодоступных биомолекул. Использование низких [P] в зональном анализе аналогично применению низких концентраций фермента в твердофазном ферментативном кинетическом анализе [7]. Было экспериментально показано (например, в работе [5]), что при низком (по отношению к $K_{\bar{L}}$) количестве фермента, введенного в аффинную матрицу, рассчитанные константы диссоциации практически не зависят от количества использованного подвижного компонента. В то же время в работе [8] предложены уравнения расчетов по методу постоянного элюирования/фронтального анализа, в которые входит точное значение концентрации подвижного компонента, нанесенного на аффинную колонку (см. также гл. 6). С практической точки зрения метод зонального элюирования экспериментально более удобен и требует гораздо меньшего количества подвижного компонента. Таким образом, зональное элюирование, по-видимому, наиболее подходящий метод для изучения большинства взаимодействий, представляющих биологический интерес. Следовательно, существует необходимость в чувствительных аналитических методах для проведения элюирования и детектирования малых количеств подвижного компонента.

3.2. Бивалентные системы

Хроматография с зональным элюированием может быть также использована для расчетов в системах бивалентного связывания, включая представленные в уравнении (4).



(4)

Как описано для систем моновалентного связывания (см. работы [9, 10]), эта схема приводит к выражению:

$$\frac{1}{V-V_0}=\frac{1+2\frac{[L]}{K_L}+\left(\frac{[L]}{K_L}\right)^2}{(V_0-V_m)\left[2\frac{[\bar{L}]}{K_{\bar{L}}}+\left(\frac{[\bar{L}]}{K_{\bar{L}}}\right)^2+2\frac{[L]\,[\bar{L}]}{K_L K_{\bar{L}}}\right]} \qquad (5)$$

Это выражение позволяет оценивать константы диссоциации K_L и $K_{\bar{L}}$ для бивалентных веществ P_2 путем измерения V при различных значениях [L]. Однако в отличие от систем моновалентного связывания для бивалентных систем зависимость $1/(V-V_0)$ от [L] нелинейна. Таким образом, K_L и $K_{\bar{L}}$ находят по данным конкурентного элюирования путем обработки нелинейной зависимости методом наименьших квадратов. Несмотря на это различие, методика для получения данных в случае систем бивалентного связывания полностью аналогична таковой для моновалентной системы.

Если зональное элюирование осуществляется в отсутствие растворимого лиганда ($[L]=0$), уравнение (5) упрощается:

$$V-V_0=(V_0-V_m)\left[2\frac{[\bar{L}]}{K_{\bar{L}}}+\left(\frac{[\bar{L}]}{K_{\bar{L}}}\right)^2\right] \qquad (6)$$

При $[L]=0$ $K_{\bar{L}}$ можно найти непосредственно по объему элюирования при одном зональном элюировании.

4. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АФФИННЫХ МАТРИЦ

Развитие аффинной хроматографии для препаративного выделения макромолекул привело к разработке многочисленных методов иммобилизации лигандов на твердых носителях. Рамки настоящей главы не позволяют рассмотреть все известные методы иммобилизации, однако остановимся на нескольких общих принципах конструирования аффинных матриц, предназначенных для использования в аналитической аффинной хроматографии.

4.1. Иммобилизация лиганда

При установлении констант равновесного связывания по данным хроматографии с зональным элюированием весьма важно, чтобы емкость колонки и сродство подвижного компонента к иммобилизованному лиганду соответствовали друг другу, только тогда можно получить в течение разумных промежутков времени вполне четкие кривые элюирования. Получение четких кривых элюирования зависит от ряда параметров, таких, как размер шариков и пор матрицы, диаметр и длина колонки и скорость потока [11, 12]. Кроме того, удерживание подвижного компонента непосредственно зависит от количества лиганда, присоединенного к матрице [1, 3]. При постоянной скорости потока и постоянном объеме колонки зоны подвижного компонента, введенного на матрицу с меньшим количеством иммобилизованного лиганда, элюируются в виде более острых пиков при меньших объемах элюирования. Увеличение количества иммобилизованного лиганда приводит к более широким пикам и бóльшим объемам элюирования. Для установления соответствующей концентрации иммобилизованного лиганда для данной серии экспериментов обычно прибегают к методу проб и ошибок. Концентрация присоединенного к твердому носителю лиганда может первоначально контролироваться путем введения в реакцию с активированным твердым носителем определенных количеств лиганда. Дальнейшим исследованием ряда препаратов матрицы с различной плотностью лиганда можно опреде-

лить оптимальную для данного подвижного компонента концентрацию лиганда. По другому способу носитель вводят в реакцию с большим количеством лиганда и затем разбавляют немодифицированной матрицей до достижения требуемой концентрации иммобилизованного лиганда. Последний метод менее желателен в случае, если высокая плотность лиганда концентрированной аффинной матрицы вызывает удерживание подвижного компонента благодаря поливалентному связыванию или стерическим трудностям.

Присоединение лигандов к твердым носителям включает две стадии — активацию твердого носителя и присоединение лиганда к активированному носителю. В некоторых случаях включаются дополнительные стадии присоединения вставок различной длины к твердому носителю. Затем лиганды могут быть присоединены к свободному концу вставки. В целом стратегия иммобилизации обычно зависит от выбранного лиганда, доступности материалов (носитель и лиганд) и очевидной необходимости сохранения биоспецифичности и контролируемой емкости. В других отношениях химическая стратегия получения аффинных матриц для аналитических или препаративных целей по существу аналогична.

4.2. Определение емкости

Если аффинная матрица предназначена для аналитических целей, необходимо определить емкость модифицированного материала. Емкость замещенной матрицы может быть функционально определена как концентрация иммобилизованного компонента, доступного для взаимодействия с подвижным компонентом. Для моновалентной (1 : 1) системы емкость может быть определена как количество подвижного компонента, связывающегося в условиях насыщения на единицу объема упакованного геля. Если связывание не эквимолярное (например, при мультивалентном связывании подвижного компонента с иммобилизованным компонентом), расчет функциональной емкости матрицы может оказаться ошибочным (занижен для мультивалентного подвижного компонента). Кроме того, измерение емкости матрицы этим методом может оказаться сложным, если сродство между взаимодействующими компонентами слишком мало для предотвращения преждевременного элюирования подвижного компонента. Насыщение матрицы может быть также невозможным, если подвижный связывающий компонент, особенно макромолекула или макромолекулярный комплекс, недоступен в достаточных количествах. В случае невозможности определения функциональной емкости матрицы наиболее целесообразно установить полное количество иммобилизованного компонента на единицу объема матрицы. Методы определения емкости матрицы приведены ниже.

Функциональная емкость упакованной колонки с замещенным твердым носителем может быть определена путем насыщения упакованной колонки подвижным связывающимся компонентом. На определенный объем матрицы наносится избыток растворенного компонента по отношению к теоретической емкости модифицированного носителя [13]. Матрица промывается уравновешивающим буфером до отсутствия в элюате связывающегося вещества. Затем связавшееся вещество элюируют и определяют его количество. Если насыщение матрицы нецелесообразно (например, ввиду низкого сродства матрицы к подвижному компоненту), связывающаяся емкость может быть измерена с помощью бетч-метода, при котором небольшие объемы аффинной матрицы смешиваются с различными концентрациями подвижного компонента с последующим определением количества связавшегося компонента при каждой концентрации и экстраполяцией полученных данных к насыщению. Это позволяет установить полное количество подвижного компонента, связывающегося с матрицей при насыщении, без действительного насыщения матрицы.

Полное количество иммобилизованного компонента может быть определено двумя путями. Первый заключается в непосредственном анализе твердого носителя. Для пептидов и белков использовали аминокислотный анализ после исчерпывающего кислотного гидролиза (6,0 М HCl, 110 °C, 24 ч, вакуум) (см., например, работу [4]). Для матриц, содержащих иммобилизованные нуклеотиды, проводилось определение фосфата [14] после исчерпывающего гидролиза модифицированной матрицы [15]. Другой метод состоит в определении после реакции присоединения количества лиганда, не связавшегося с твердым носителем. Количество иммобилизованного лиганда определяется вычитанием количества лиганда, остающегося в растворе после реакции (включая промывные воды), от исходного количества лиганда.

4.3. Примеры получения аффинных матриц

4.3.1. pdTp-аминофенил-сефароза. Нуклеаза стафилококков, полученная из *Staphylococcus aureus*, гидролизует РНК и ДНК. Тимидин-3′,5′,-дифосфат (pdTp) — сильный ингибитор этого фермента; поэтому он был выбран в качестве лиганда для присоединения к сефарозе с целью аффинной хроматографии этого фермента [16]. pdTp-аминофенил-сефарозу получают в результате одностадийной реакции конденсации бромоцианактивированной сефарозы с 3′-(4-аминофенилфосфорил)-дезокситимидин-5′-фосфатом (pdTpAP).

1) Бромоцианактивированную сефарозу, которую можно приготовить (см. гл. 2 разд. 1 и работу [17]) или использовать в виде продажного препарата, промывают 0,1 М бикарбонатным буфером (pH 9) и суспендируют в равном объеме того же буфера.

2) Добавляют лиганд pdTpAP в растворе, составляющем ~5—15% конечного объема.

3) Суспензию осторожно перемешивают (чтобы не повредить шарики сефарозы) при 4 °С в течение 24 ч и затем тщательно промывают водой и буфером.

Установлено, что при использовании в реакции иммобилизации 2,5 и 0,5 мкмоль растворимого лиганда на 1 мл сефарозы количество лиганда, присоединенного к бромоцианактивированной сефарозе в описанных выше условиях, в одном случае составляло 1,5 и 0,3 мкмоль/мл сефарозы [16]. Емкость приготовленного сорбента устанавливалась путем насыщения известного количества иммобилизованного лиганда чистой нуклеазой стафилококков. Связанный белок элюировали и определяли его количество по ферментативной активности. С матрицами, содержащими 1,5 и 0,3 мкмоль лиганда/мл сефарозы, связывалось 8 и 1,2 мг нуклеазы/мл сефарозы. Зная содержание фосфата в сорбентах и принимая, что фермент связывается с иммобилизованным лигандом в молярном соотношении 1 : 1 [16], можно рассчитать, что максимальное теоретическое связывание фермента с сорбентом составляет 28 и 6 мг/мл соответственно. При аналитическом элюировании с pdTpAP-сефарозы, описанном в разд. 6.1, $[\bar{L}]=0{,}05$ ммоль/л (функциональная емкость сорбента), а при расчете по содержанию фосфата эта величина составляет 0,21 ммоль/л.

4.3.2. Фосфорилхолин-сефароза. Известно, что бивалентные IgA-антитела (ТЕРС 15), выделенные из BALB/c мышиной гамма-А-миеломы, специфически связываются с фосфорилхолином. Фосфорилхолин, присоединенный к сефарозе, успешно использован в качестве аффинной матрицы как в препаративной [18], так и в количественной аффинной хроматографии [9]. Аффинная матрица была получена в две стадии [18]. На первой стадии глицилтирозин присоединяли к CNBr-активированной сефарозе через α-аминогруппу глицина; вторая стадия — реакция замещения, при которой диазогруппа *п*-диазонийфенилфосфорилхолина атакует *орто*-положение по отношению к гидроксильной группе фенольного кольца связанного с матрицей глицилтирозина. Для аналитических целей эта замещенная матрица может быть получена путем взаимодействия определенного количества CNBr-активированной сефарозы (10 мл влажного сорбента) с 35 мкмоль глицилтирозина [9]. Получение CNBr-активированной сефарозы и последующую реакцию с глицилтирозином проводят в соответствии с опубликованными методиками [17]. После первой реакции иммобилизации замещенный гель промывают боратным солевым буфером (рН 8,0), затем суспендируют в том же буфере и обрабатывают 5 мкмоль *п*-диазонийфенилфосфорилхолина. Перемешивают эту смесь при комнатной температуре в течение ночи. По окончании реакции замещенный гель промывают водой и хранят в 1,0 М уксусной кислоте при 4 °С.

Полное количество фосфорилхолина, присоединенного к матрице, определяют по содержанию фосфата. Для матрицы, полученной при отношении Gly-Tyr : активированная сефароза, равном 35 мкмоль : 10 мл, содержание фосфата составляло $1{,}0\cdot10^{-3}$ моль/л. Функциональную емкость измеряют путем насыщения 0,1 мл замещенной смолы 2 мг мономера IgA, содержащего радиоактивно меченные антитела в качестве изотопного индикатора. Колонку промывают солевым фосфатным буфером, содержащим 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, до полного удаления несвязавшегося белка. Антитела, специфически связавшиеся с колонкой, элюируют буфером, содержащим 10^{-3} моль/л фосфорилхолина. Емкость фосфорилхолин-сефарозы по IgA-антителам, выраженная как количество элюированных на этой стадии антител, составляла $5\cdot10^{-5}$ моль/л [9].

Для аналитического использования может быть получен более разбавленный гель; в этом случае на 10 мл активированной сефарозы берут 3,5 мкмоль Gly-Tyr. Его функциональная емкость составляла $9\cdot10^{-6}$ моль/л [9]. Как эта разбавленная, так и описанная выше более концентрированная матрицы были использованы для аналитического элюирования, описанного в разд. 6.2.

4.3.3. Метионил-тирозил-фенилаланил-аминоалкил-агароза. Нейрофизины (группа кислотных белков с молекулярной массой 10 000 дальтон, первоначально выделенных из задней доли гипофиза) нековалентно связывают нейропептидные гормоны, окситоцин и вазопрессин. Интенсивные исследования показали, что в гормонах наиболее важную роль в белок-полипептидном взаимодействии играют N-концевые остатки из трех аминокислот (полуцистин — N-концевая аминокислота, затем тирозин и либо фенилаланин в вазопрессине, либо изолейцин в окситоцине) [19]. Трипептидный амид Met-Tyr-Phe-амид — эффективный лиганд для гормонсвязывающего положения в нейрофизинах.

Показано, что конденсация трипептида (свободная кислота) с агарозным твердым носителем через аминоалкильную вставку приводит к эффективному и удобному аффинному адсорбенту, который можно использовать и в препаративной, и в количественной аффинной хроматографии нейрофизинов [4, 20].

Met-Tyr-Phe-аминогексил-агароза может быть получена в результате одностадийной реакции конденсации между *п*-нитрофенилсульфенил-Met-Tyr-Phe (НФС-Met-Tyr-Phe) и ω-аминогексил-агарозой [20].

1) НФС-Met-Tyr-Phe (20 мг в 5,5 диоксана) добавляют к 5 мл (упакованный объем геля в воде) ω-аминогексилагарозы.

2) Для проведения реакции присоединения добавляют по 33 мкмоль дициклогексилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида (1 мкмоль/мкл в ДМФА).

3) Через 20 ч при комнатной температуре замещенный гель отфильтровывают и промывают последовательно смесью диоксан — вода (1 : 1, об./об.), метанол — вода (1 : 1, об./об.), водой, 1,0 *М* NaCl и водой.

4) Полученный желтый сорбент суспендируют в 0,2 *М* ацетате аммония (pH 5,2), содержащем 0,2 моль/л тиосульфата натрия, и перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре для удаления НФС-защитной группы с концевой аминогруппы пептида.

5) Гель отфильтровывают и промывают водой, метанолом, водой, смесью ДМФА — вода (1 : 1, масс./об.) и водой.

Аминокислотным анализом матрицы, полученной по приведенной выше методике, установлено, что 0,85 мкмоль Met-Tyr-Phe-трипептида присоединилось к 1 мл упакованного геля.

Для аналитических экспериментов, описанных в разд. 6.3, использовали аффинные матрицы с установленной аминокислотным анализом концентрацией иммобилизованного лиганда, равной 0,59 и 0,30 ммоль/л для Met-Tyr-Phe-аминогексил- и аминобутил-агарозы.

4.3.4. БНФ-II-сефароза. В дополнение к лиганд-связывающей активности нейрофизинов (как описано выше), это семейство белков обладает также свойством самоассоциировать с образованием димеров из мономерных субъединиц. Это взаимодействие было изучено количественно методом аффинной хроматографии с использованием матрицы, представляющей собой бычий нейрофизин II (БНФ-II), присоединенный к сефарозе [4, 21, 22]. Сорбент БНФ-II-сефароза может быть получен в результате одностадийной реакции между CNBr-активированной сефарозой и БНФ-II в 0,1 *М* бикарбонате натрия (pH 8,5), содержащем 0,5 моль/л хлорида натрия, при осторожном перемешивании в течение ночи при 4 °С. Полученный гель промывают буфером для присоединения и перемешивают с 1,0 *М* этаноламином в том же буфере в течение 3 ч при комнатной температуре, затем промывают буфером для присоединения и 0,1 *М* ацетатом, содержащим 1 моль/л хлорида натрия (pH 3,5). Замещенная матрица для аналитического эксперимента, описанного в разд. 6.4, была получена взаимодействием 1 г активированной сефарозы с 5 мг БНФ-II и содержала по данным аминокислотного анализа 1,4 мг БНФ-II/мл упакованного геля.

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ. КОНТРОЛЬ ЭЛЮИРОВАНИЯ

5.1. Приготовление образцов и введение радиоизотопной метки

5.1.1. Общие замечания. Образцы, используемые для количественной аффинной хроматографии, должны быть высокоочищенными и поэтому перед аналитической хроматографией их часто подвергают очистке путем препаративной аффинной хроматографии. Кроме того, приготовление образца имеет специфические особенности для конкретной системы. В случаях когда чувствительный анализ (например, ферментативная активность или радиоиммуноанализ) для определения подвижного компонента не может быть применен, следует отдать предпочтение введению радиоизотопной метки. Основными критериями для выбора метода введения радиоизотопной метки в подвижный компонент являются достижение достаточного уровня радиоактивности, позволяющего проводить последующее детектирование небольших количеств компонента, содержащихся в элюате, а также сохранение биоспецифической природы связывания меченых молекул. Наиболее распространенные методики введения метки в белки основаны на использовании ^{125}I (который вводится путем обработки N-сукцинимидил-3-(4-гидрокси-5-[^{125}I]иодофенил) пропианатом [23]) и трития (восстановительное метилирование [24] и [^{14}C]карбамилирование [25]).

5.1.2. Восстановительное алкилирование. Тритиированные IgA-антитела могут быть получены восстановительным метилированием мономерного IgA [9]. Для этого мономерный IgA растворяют в 0,2 M борате (pH 8,3; 2 мг восстановленного и алкилированного IgA на 2 мл буфера). К раствору добавляют 40 мКи [^{3}H]борогидрида натрия (10 Ки/ммоль, поставляется фирмой New England Nuclear Inc.). Для осуществления реакции метилирования добавляют 20 мкл формальдегида в виде 0,4%-ного раствора (при охлаждении льдом продолжительность реакции 10 мин). По окончании реакции непрореагировавшие реагенты удаляются путем гель-фильтрации, а затем проводят диализ меченного тритием белка против NaCl-натрийфосфатного буфера (pH 7,4). Удельная активность [^{3}H]белка, приготовленного при соблюдении описанных выше количественных соотношений (использован для экспериментов, приведенных в разд. 6.2), составляет ~0,5 мкКи/мкг.

5.1.3. Карбамилирование. Меченный углеродом-14 бычий нейрофизин I ([^{14}C]БНФ-I) получен [22] карбамилированием натив-

ного БНФ-I с ^{14}C-меченным цианатом калия (KCNO, удельная активность 6,2 мКи/ммоль). Для этого БНФ-I (12 мг) растворяют в 0,5 M борате (pH 8,5; 0,75 мл) и обрабатывают 12 мг [^{14}C]меченного KCNO в течение 15 ч при комнатной температуре. По окончании реакции раствор подкисляют до pH 7,4 путем добавления ледяной уксусной кислоты; смесь фракционируют путем гель-фильтрации (сефадекс G-50, 0,9×58 см, уравновешен NaCl-натрийфосфатным буфером, pH 7,4). Удельная активность полученного таким образом меченого БНФ-I составляет ~1 нКи/мкг белка. Показано, что меченный подобным образом нейрофизин сохраняет способность биоспецифически связываться с лизинвазопрессин-сефарозой [22]; он был использован в аналитической аффинной хроматографии [20].

5.1.4. Иодирование. ^{125}I-Меченный БНФ-II может быть получен [4] по реакции с N-сукцинимидил-3-(4-гидрокси-5-[^{125}I]иодофенил)пропионатом [23]. В типичном эксперименте добавляют аликвоту (20 мкл) БНФ-I или II (5 мг/мл в ацетате аммония, pH 5,7) и 40 мкл 1,0 M бората (pH 8,5) к высушенному реагенту Болтона — Хантера (1 мКи; 2000 Ки/моль, поставляется фирмой New England Nuclear). Через 15—30 мин при охлаждении льдом и эффективном перемешивании обрабатывают избыток реагента в течение 10—15 мин при охлаждении льдом с 300—500 мкл 0,2 M глицина в 0,5 M борате (pH 8,5). После этого отделяют [^{125}I]БНФ-I или II от реагентов путем хроматографии на сефадексе G-25 (PD-10, Pharmacia) в 0,2 M уксусной кислоте и после удаления кислоты проводят очистку путем препаративной аффинной хроматографии на Met-Tyr-Phe-аминогексил-агарозе [20]. Радиоактивно меченный материал в 0,4 M ацетате аммония (pH 5,7) специфически связывается с матрицей и элюируется 0,2 M уксусной кислотой; он может быть лиофилизован в присутствии кристаллического бычьего сывороточного альбумина. Для получения основного раствора высушенный меченый белок растворяют в 10 мM фосфате (pH 7,4). Использованный в экспериментах, приведенных в разд. 6.3, препарат [^{125}I]БНФ-II имел удельную активность, равную 2,5 мкКи/нмоль белка [4], в то время как препарат для экспериментов по элюированию, описанных в разд. 6.4, — 0,3 мкКи/нмоль [21].

5.2. Контроль элюирования

5.2.1. Анализ ферментов. В исследованиях взаимодействий фермент — иммобилизованный ингибитор можно использовать ферментативную активность для контроля элюирования зоны фермента с матрицы. Преимуществом этого подхода является отсутствие необходимости ковалентной модификации образца. В то

же время, если проводятся конкурентные элюирования, фракции, содержащие элюированный фермент, могут нуждаться в предварительном разбавлении или диализе для уменьшения влияния растворимого конкурирующего лиганда на ферментативную активность.

5.2.2. Измерение радиоактивности. Радиоактивно меченные образцы могут быть определены с высокой чувствительностью. Так, когда контроль элюирования по другим характерным для данной молекулы активностям недостаточно чувствителен, введение радиоактивной метки (радиоактивного изотопа) дает возможность определения небольших количеств подвижного компонента, с которыми и имеют дело в аффинной хроматографии с зональным элюированием (см. разд. 2 или 3.1). Определение радиоактивности меченных образцов является прямым методом. При использовании углерода-14 и трития в качестве радиоактивных меток измерение радиоактивности проводят на сцинтилляционном счетчике; измеряемые образцы готовят путем смешивания определенной аликвоты жидкого сцинтиллятора с соответствующим количеством (для достижения равного гашения компонентами буфера) каждой фракции элюата. Введение в хроматографическую систему сцинтилляционного счетчика дает возможность исключить необходимость отбора образцов, хотя по крайней мере для существующих приборов чувствительность детектирования при этом уменьшается.

[^{125}I]-меченные образцы дают возможность наиболее удобно контролировать процесс элюирования при высокой чувствительности детектирования. Фракции элюата могут сразу поступать в автоматический гамма-счетчик. В этом случае благодаря простоте работы с образцами и легкости получения данных исследователь может снимать большое количество кривых элюирования с колонки за короткое время. Образцы, меченные иодом-125 с умеренной удельной активностью (5—500 нКи/мкг), можно детектировать просто и надежно при нанесении в субмикрограммовых количествах.

5.2.3. Другие методики. Когда определение ферментативной активности или прямые измерения радиоактивности не подходят для контроля элюирования, следует рассмотреть другие возможности для анализа связывания. Наибольшего внимания в качестве общего чувствительного метода количественного измерения подвижного компонента заслуживает, по-видимому, радиоиммуноанализ. Кроме того, может оказаться целесообразным измерение количества элюированного подвижного компонента с помощью количественного лигандсвязывающего анализа, например в случае доступности радиоактивно меченного лиганда, аналогичного по структуре иммобилизованному лиганду.

6. ПРИМЕРЫ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИТИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ЗОНАЛЬНЫМ ЭЛЮИРОВАНИЕМ

С использованием количественной аффинной хроматографии с зональным элюированием был изучен ряд взаимодействующих систем белок — лиганд и белок — белок. Ниже приведены несколько типичных примеров, показывающих обычные хроматографические результаты, получаемые при изучении моновалентных (например, нуклеаза стафилококков — нуклеотид), бивалентных (например, ТЕРС 15 IgA бивалентный мономер — фосфорилхолин) и кооперативных (например, БФН-II — пептидный гормон) взаимодействующих систем.

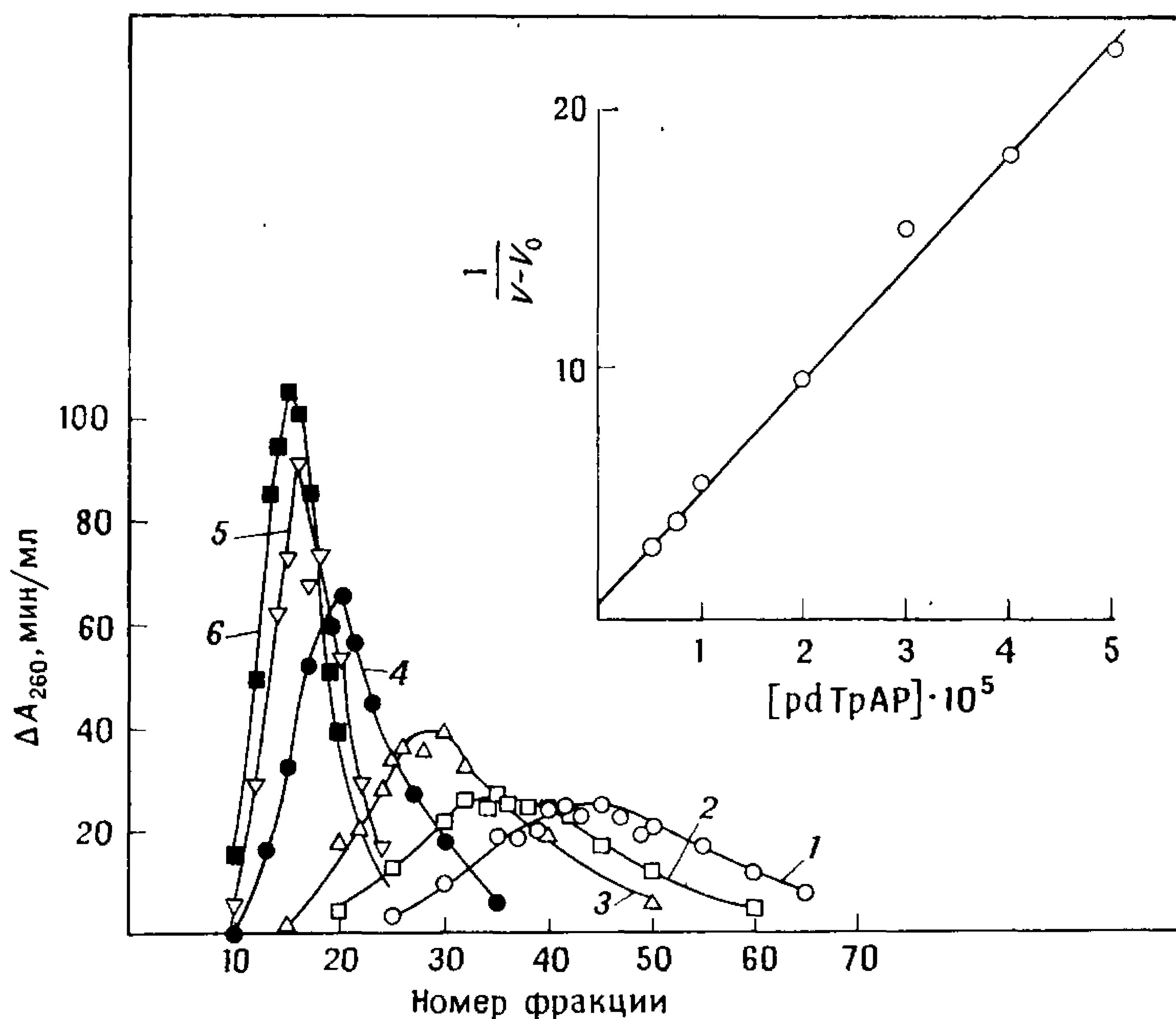


Рис. 4. Аффинная хроматография с конкурентным зональным элюированием для системы с моновалентным связыванием. Зоны, содержащие равные количества нуклеазы стафилококков, наносили на колонку с pdTpAP-сефарозой (0,9·15 см, $[\bar{L}]=0{,}05$ ммоль/л), уравновешенную 0,1 *M* ацетатом аммония (pH 5,7), содержащим растворимый конкурентный лиганд pdTpAP в концентрации (моль/л): *1* — $0{,}5\cdot10^{-5}$; *2* — $0{,}785\cdot10^{-5}$; *3* — $1{,}0\cdot10^{-5}$; *4* — $2\cdot10^{-5}$; *5* — $3\cdot10^{-5}$; *6* — $4{,}0\cdot10^{-5}$; для элюирования использовали те же буферы. Элюирование осуществляли при комнатной температуре. В правом верхнем углу по основным данным (и дополнительно для концентрации [pdTpAP] $5\cdot10^{-5}$) построена зависимость $1/(V-V_0)$ от [pdTpAP]. Из этого графика с использованием уравнения (2) (см. разд. 3.1) рассчитаны константы диссоциации K_L и $K_{\bar{L}}$, приведенные в табл. 1 [3].

Таблица 1. Характеристика аффинных матриц, анализ кривых при количественной аффинной хроматографии

Подвижный компонент	Количество подвижного компонента в нанесенной зоне, мкг	Аффинная матрица	$[\bar{L}]$, моль/л	Метод определения $[\bar{L}]$
Нуклеаза стафилококков	200	PdTpAP-сефароза	$5 \cdot 10^{-5}$	Функциональная емкость
$[^{14}C]$IgA бивалентный мономер[б]	25	Фосфорилхолин-сефароза	$5 \cdot 10^{-5}$ $9 \cdot 10^{-6}$	»
$[^{3}H]$IgA моновалентный Fab[в]	0,04	»	$5 \cdot 10^{-5}$ $9 \cdot 10^{-6}$	»
$[^{125}I]$ БНФ-II[г]	<1	Met-Tyr-Phe-аминогексил-агароза	$5{,}9 \cdot 10^{-4}$	Аминокислотиый анализ
	101	Met-Tyr-Phe-аминогексил-агароза	$5{,}9 \cdot 10^{-4}$	»
	<1	БНФ-II-сефароза	$1 \cdot 10^{-4}$	»

[а] Все приведенные эффекторы — конкурентные лиганды за исключением лизинвазо dTpNp — дезокситимидин-3′-*п*-нитрофенилфосфат; pdTpAP — дезокситимидин-5′-фосфат-3′-

[б] ТЕРС 15, IgA, восстановленный в мягких условиях и алкилированный $[^{14}C]$ иодо-

[в] Fab-фрагменты, полученные из ТЕРС 15 IgA мономеров ограниченным протеолизом

[г] БНФ-II после реакции с реагентом Болтона — Хантера, меченного ^{125}I.

6.1. Связывание нуклеазы стафилококков с иммобилизованными нуклеотидами

На рис. 4 представлены результаты, полученные при элюировании зон нуклеазы стафилококков с pdTpAp-сефарозы при различных концентрациях растворимого конкурентного лиганда [3]. Линейность зависимости $1/(V—V_0)$ от [L] отражает 1 : 1-природу взаимодействия фермент — нуклеотид; эта зависимость может быть использована для расчета констант диссоциации K_L и $K_{\bar{L}}$ с использованием моновалентных моделей [уравнение (2)]. Рассчитанные константы приведены в табл. 1; там же приведены результаты для двух других конкурентных лигандов.

элюирования, методы расчета и значения констант, полученные с зональным элюированием

Эффектор [a]	Метод детектирования элюированного подвижного компонента	Модель для расчета K_L и $K_{\bar{L}}$	K_L, моль/л	$K_{\bar{L}}$, моль/л	Литература
PdTpAP	Определение ферментативной активности	Уравнение (2)	$2,3 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	3
PdTp	То же	»	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	3
dTpNP	»	»	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	3
Фосфорилхолин	Определение радиоактивности на сцинтилляционном счетчике	Уравнение (5)	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$	9
		»	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	9
		Уравнение (2)	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	9
»	То же	»	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	9
		»	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$3,9 \cdot 10^{-6}$	9
Окситоцин	Детектор γ-измерения	»	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$ (при [L]≠0)	4
	То же	Уравнение (3)	—	$4,8 \cdot 10^{-5}$ (при [L]=0)	4
»	»	Уравнение (2)	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$7,0 \cdot 10^{-7}$ (при [L]≠0	4
—	»	Уравнение (3)	—	$6,1 \cdot 10^{-6}$ при [L]=0)	4
Нет	»	»	—	$1,4 \cdot 10^{-5}$	21
Лизинвазопрессин ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	»	»	—	$4,4 \cdot 10^{-7}$	21

прессина, являющегося достоверным эффектором; pdTp — 3′,5′-дезокситимидиндифосфат; *п*-аминофенилфосфат.

ацетамидом.

папаином белка, тритиированного восстановительным метилированием.

Таким образом, этим методом можно устанавливать сразу несколько констант равновесного связывания для ряда конкурирующих лигандов и благодаря этому оценивать специфичность взаимодействия.

6.2. Бивалентный иммуноглобулин A (TEPC 15 IgA мономер) — фосфорилхолин

При конкурентном элюировании бивалентных мономеров TEPC 15 IgA, полученных восстановлением и селективным алкилированием TEPC 15 IgA, с иммобилизованного фосфорилхолина при концентрации лиганда $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (функциональная

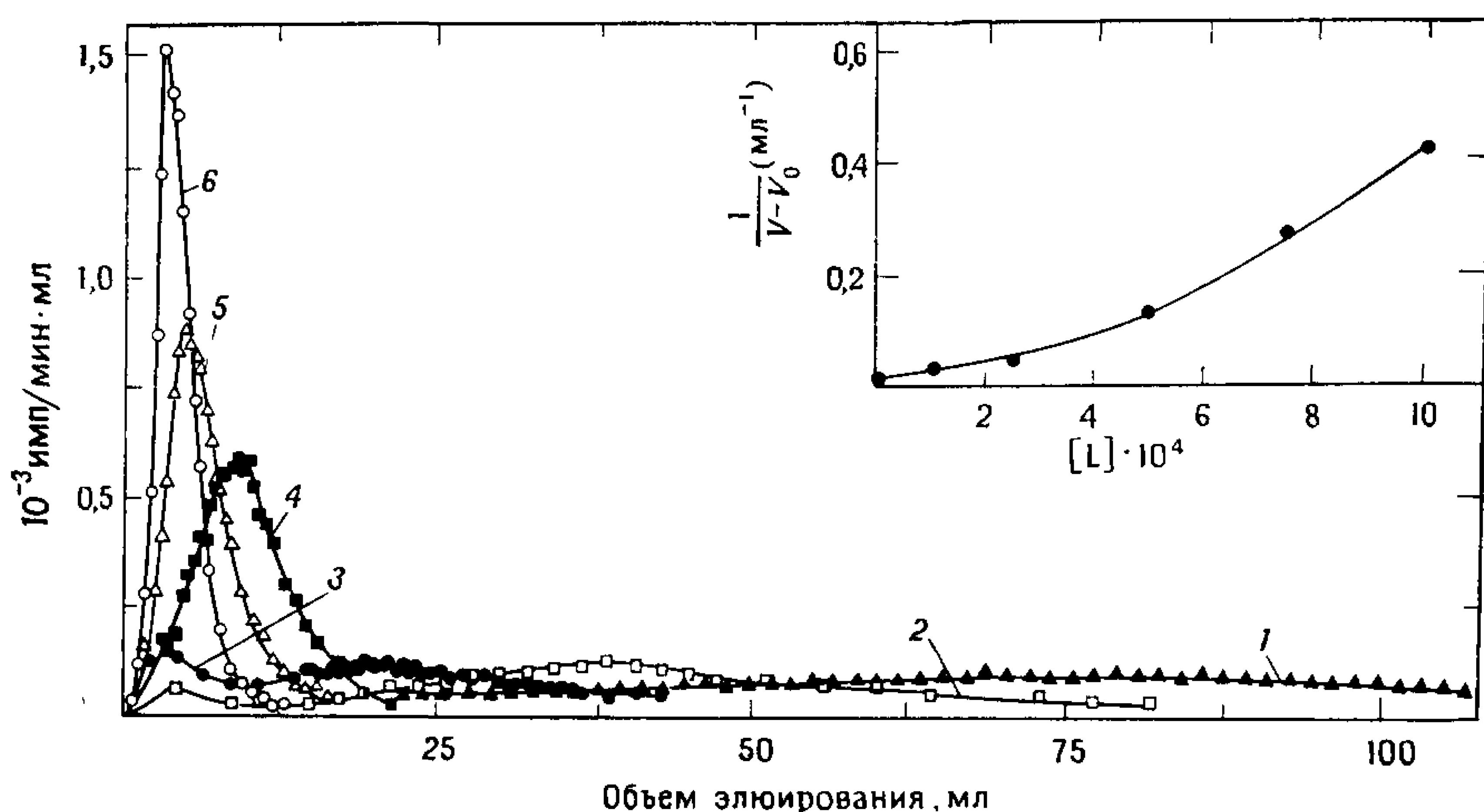


Рис. 5. Аффинная хроматография с конкурентным зональным элюированием для системы с бивалентным связыванием. Зоны (100 мкл) мономера [^{14}C]IgA (бивалентное связывание) наносили на фосфорилхолин-сефарозу с высокой плотностью лиганда (7×25 мм, $[\overline{L}]=5\cdot10^{-5}$ моль/л), уравновешенную NaCl-натрийфосфатным буфером (содержащим 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина); фосфорилхолин имел следующие концентрации (моль/л): *1* — 0; *2* — $1\cdot10^{-6}$; *3* — $2{,}5\cdot10^{-6}$; *4* — $5{,}0\cdot10^{-6}$; *5* — $7{,}5\cdot10^{-6}$; *6* — $1{,}0\cdot10^{-5}$. Элюирование осуществляли при комнатной температуре буфером, содержащим указанное количество растворенного конкурентного фосфорилхолина. В правом верхнем углу по данным элюирования построена зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации фосфорилхолина. Константы диссоциации K_L и $K_{\overline{L}}$ рассчитаны с помощью этого графика с использованием уравнения (5) и приведены в табл. 1 [9].

емкость) в присутствии растворимого фосфорилхолина зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации растворимого конкурентного лиганда нелинейна [9] (рис. 5), что согласуется с вероятностью бивалентного связывания мономера IgA с аффинной матрицей. Вследствие этого параметры взаимодействия K_L и $K_{\overline{L}}$ были рассчитаны с использованием бивалентной модели [уравнение (5)]. Найденные значения приведены в табл. 1. Если бивалентный IgA элюируется с фосфорилхолин-сефарозы при концентрации иммобилизованного лиганда $9\cdot10^{-6}$ моль/л, изменение объема элюирования при изменении концентрации растворимого фосфорилхолина согласуется, как показано на рис. 6, с моновалентной моделью. В этом случае при уменьшенной плотности связывающих положений матрицы исключается сколько-нибудь значительная возможность одновременного связывания белка по двум положениям матрицы. Таким образом, как моновалентная, так и бивалентная модели могут использоваться для расчета значений K_L и $K_{\overline{L}}$, что отражено в табл. 1.

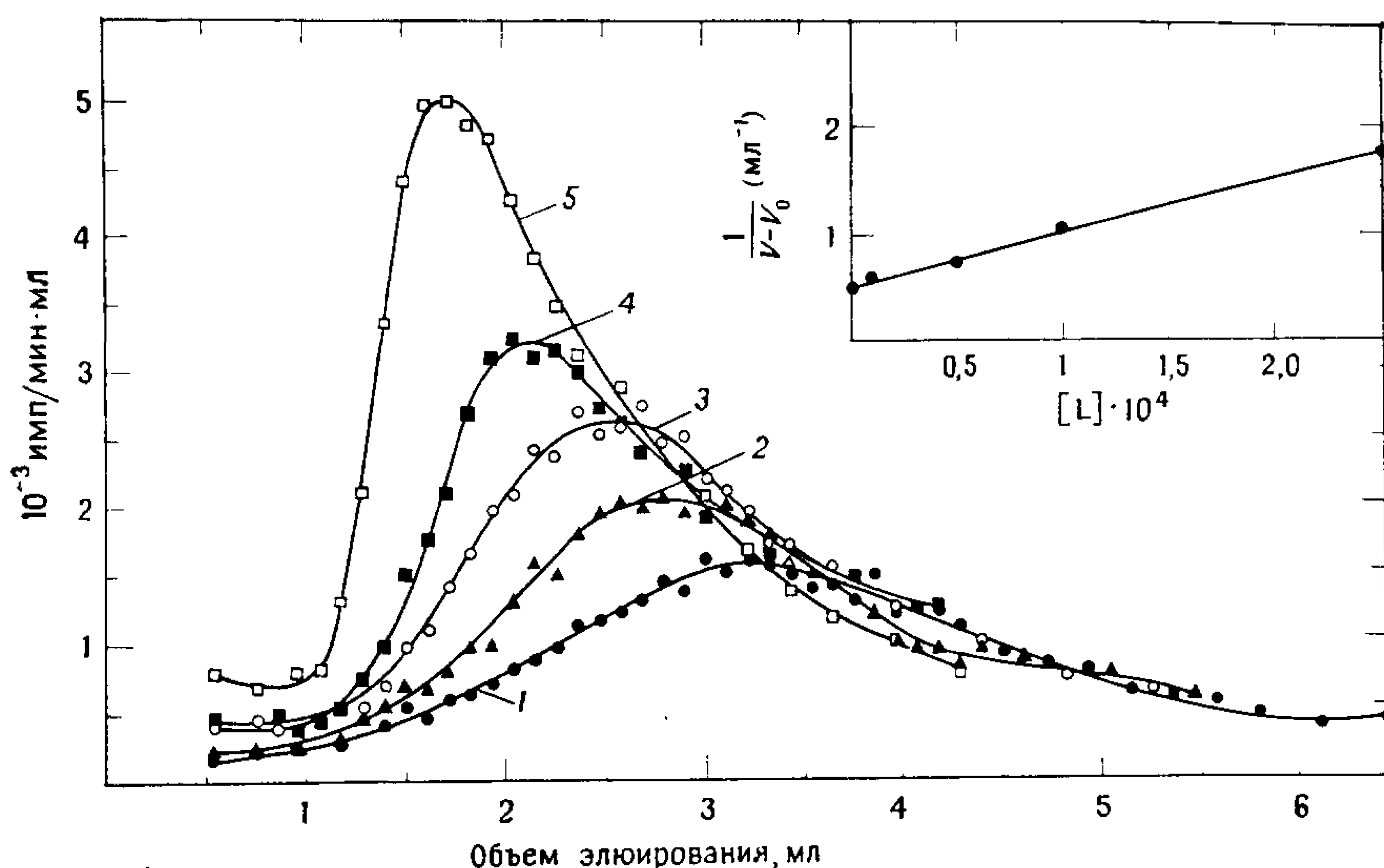


Рис. 6. Конкурентное зональное элюирование бивалентных мономеров IgA с фосфорилхолин-сефарозы с низким содержанием лиганда. Зоны мономера [^{14}C]IgA наносили на фосфорилхолин-сефарозу с низкой плотностью лиганда (7×25 мм, [L]=9·10^{-6} моль/л); условия элюирования аналогичны приведенным на рис. 5 для колонки с фосфорилхолин-сефарозой с высокой плотностью; использованы следующие концентрации растворенного фосфорилхолина (моль/л): *1* — 0; *2* — 1·10^{-7}; *3* — 5·10^{-7}; *4* — 1·10^{-6}; *5* — 2,5·10^{-6}. В правом верхнем углу построена зависимость $1/(V-V_0)$ от [L] [9].

В то время как элюирование мономера IgA при более высокой концентрации аффинной матрицы (5·10^{-5} моль/л) приводит к нелинейным зависимостям $1/(V-V_0)$ от [L], элюирование моновалентных Fab-фрагментов, полученных из IgA, с той же самой матрицы свидетельствует о линейном поведении (рис. 7). Это подтверждает вывод о том, что отклонение от линейности в случае мономеров IgA на самом деле обусловлено возникающим бивалентным связыванием с аффинной матрицей при близком расположении положений связывания (высокая плотность замещения).

6.3. Бычий нейрофизин II — пептиды

Поведение БНФ-II при зональном элюировании с Met-Tyr-Phe-аминоалкил-агароз соответствует схеме кооперативного связывания, отличающейся от строго моновалентных или бивалентных моделей. Объемы элюирования обычно уменьшаются с увеличением концентрации конкурентного пептида (например, окситоцина или вазопрессина) в элюирующем буфере, как показано, например, на рис. 3. Однако, когда полученные при кон-

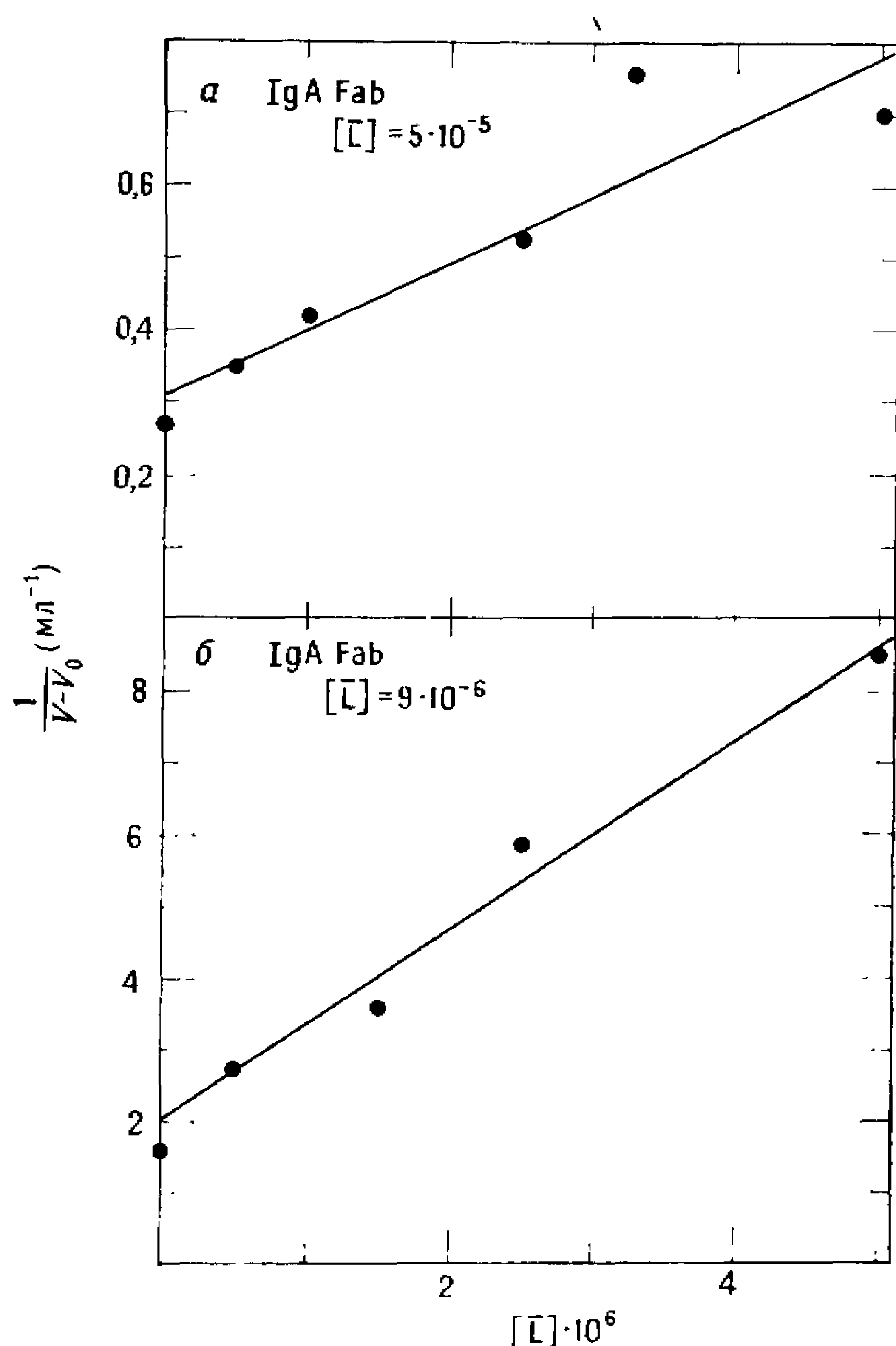


Рис. 7. Элюирование Fab-фрагментов [^{3}H]IgA на колонке с фосфорилхолин-сефарозой с высокой (*а*) и низкой (*б*) плотностью лиганда. Хроматографические условия элюирования зон Fab-фрагментов [^{3}H]IgA аналогичны приведенным на рис. 5 для мономера IgA. Константы диссоциации K_L и $K_{\bar{L}}$ рассчитаны по линейным графикам с использованием уравнения (2) и приведены в табл. 1 [9].

курентном элюировании данные были выражены графически как $1/(V-V_0)$ от [L], в большинстве случаев наблюдалось отклонение от линейности при низких [L] (рис. 8). Причина этого поведения объясняется тем фактом, что нейрофизин представляет собой смесь мономеров с низким сродством и димеров с высоким сродством, причем степень димеризации увеличивается при связывании с пептидным лигандом. Таким образом, в то время как элюирование нейрофизина в отсутствие растворенного лиганда отражает аффинное связывание с матрицей смеси, содержащей значительное количество мономеров, элюирование в присутствии низкой концентрации растворенного пептида оказалось более замедленным, чем ожидалось; это отражает элюи-

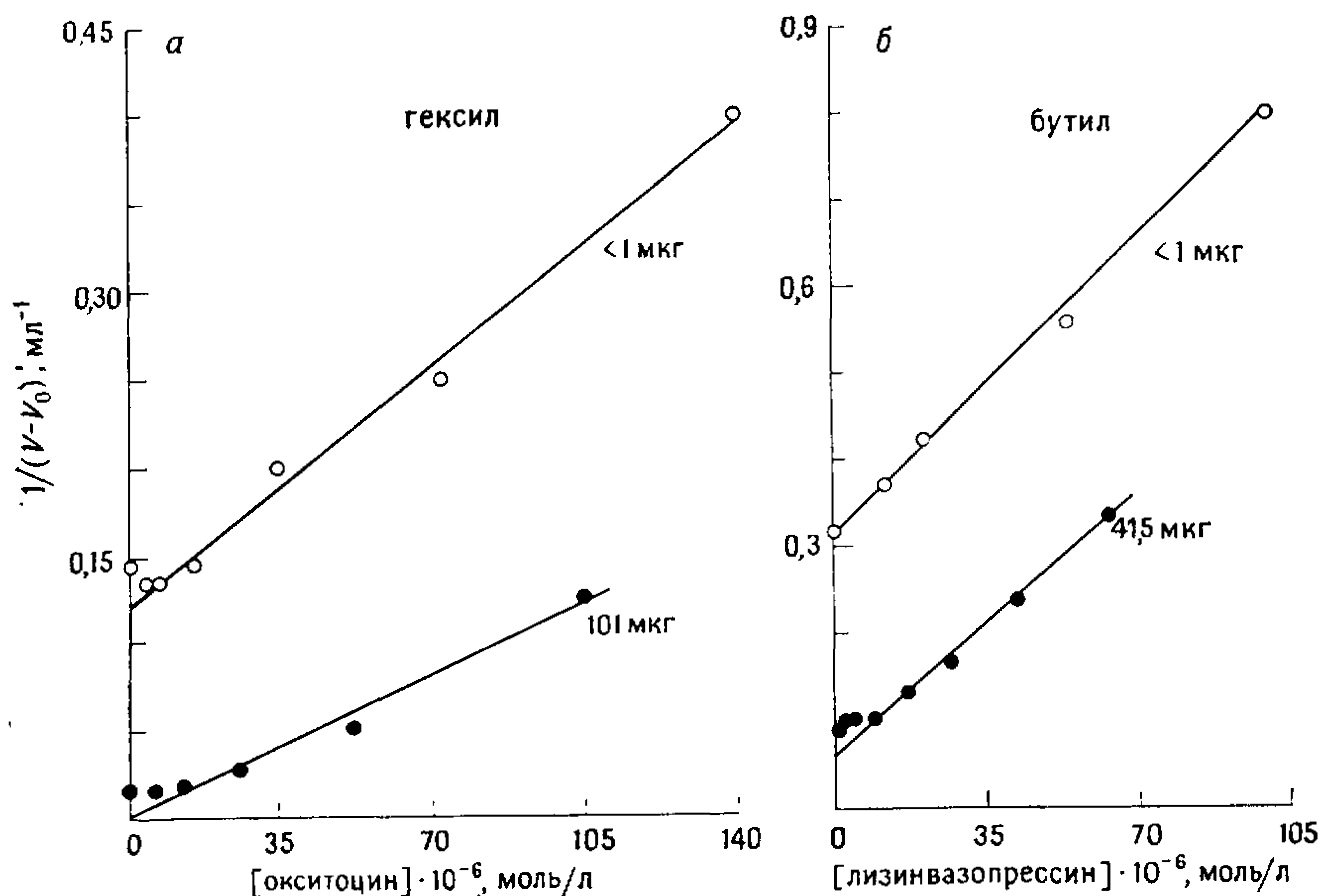


Рис. 8. Линейные графики данных конкурентного зонального элюирования [^{125}I]-меченного бычьего нейрофизина II ([^{125}I]-БНФ-II с Met-Tyr-Phe-аминогексилагарозы (*а*) и Met-Tyr-Phe-аминобутил-агарозы (*б*) (колонки с 2 мл сорбента, внутренний диаметр 7 мм). Результаты элюирования для серии опытов, показанных на рис. 3, и трех других аналогичных серий (здесь приведены графически в виде зависимости $1/(V—V_0)$ от концентраций конкурентного лиганда [L], который в этом случае являлся нейропептидным гормоном окситоцином или лизинвазопрессином). *1* — элюирование при низкой общей концентрации белка в зоне, нанесенной на колонку (только <1 мкг [^{125}I]-БНФ-II); *2* — элюирование при высоком общем количестве белка, нанесенного на колонку (1 мкг [^{125}I]-БНФ-II+101 мкг или 41,5 мкг немеченого БНФ-II). Прямые построены путем обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов; вблизи [L]=0 наблюдается отклонение от линейности, и эта область не учитывалась при построении прямых. Константы диссоциации K_L и $K\bar{L}$, рассчитанные по линейным графикам с использованием уравнения (2) и (3), приведены в табл. 1 [4].

рование смесей, существенно обогащенных димерами с высоким сродством. Увеличение низких концентраций растворенного пептида приводит к более плавному уменьшению объемов элюирования, чем ожидалось на основании степени конкурирования растворенных пептидов и аффинной матрицы за связывание с нейрофизином, находящимся в растворе [4].

Более высокое сродство димеров к пептидам по сравнению с мономерами выражается также в сильной зависимости объема элюирования нейрофизина от количества (т. е. концентрации) нейрофизина в первоначальной зоне. Так, увеличение концентраций белка в зоне приводит к увеличению удерживания (рис. 9).

6.4. Нейрофизин — нейрофизин

Степень димеризации нейрофизина была установлена при элюировании нейрофизина с иммобилизованного нейрофизина. Как показано в правом верхнем углу рис. 10, зональное элюирование [^{125}I]БНФ-II в буфере (не содержащем растворенного пептидного лиганда) свидетельствует об удерживании, достаточно отличающемся от V_0, что позволяет рассчитывать константу димеризации как K_L (табл. 1). При включении растворимого

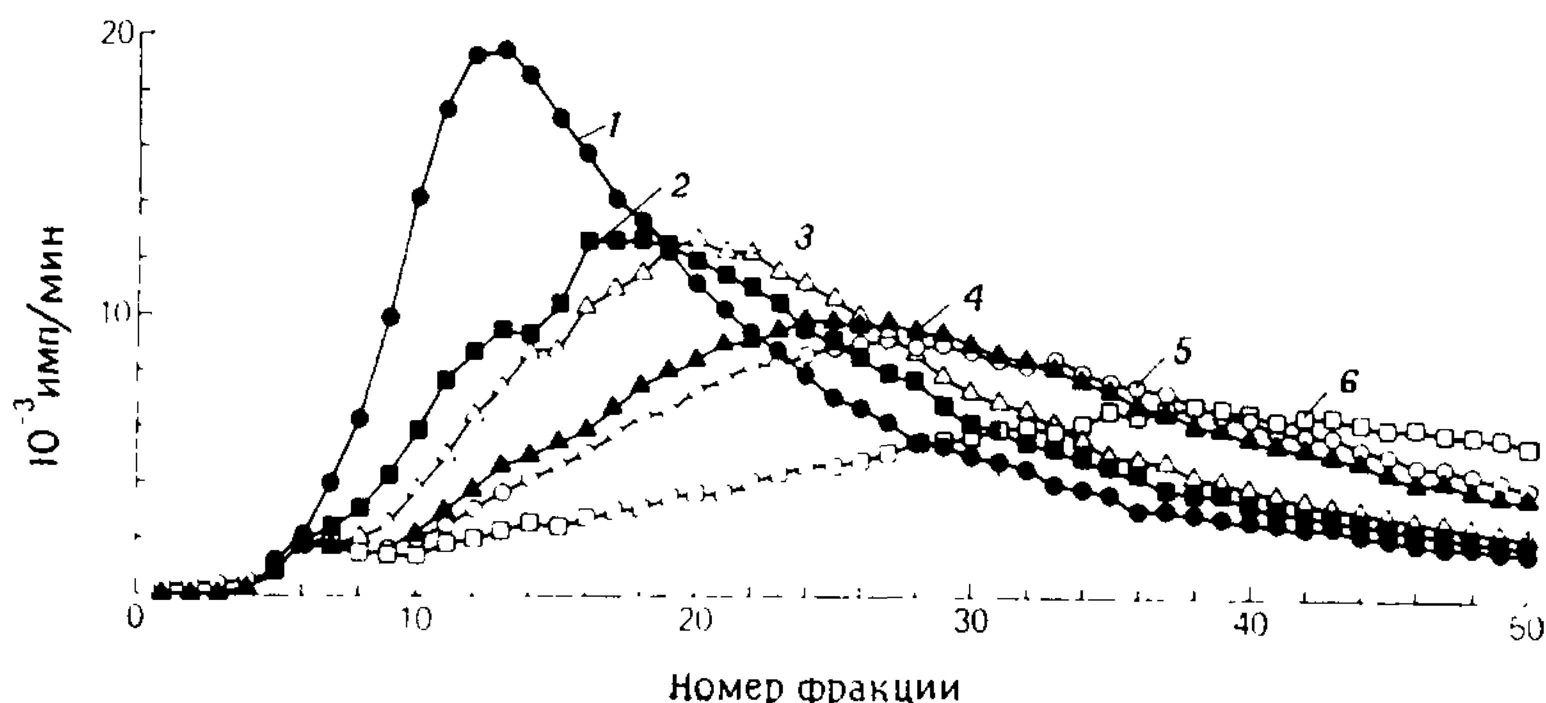


Рис. 9. Влияние концентрации введенного на колонку бычьего нейрофизина II (БНФ-II) на характер зонального элюирования с Met-Tyr-Phe-аминобутил-агарозы. Зоны (100 мкл), содержащие <1 мкг [^{125}I]-БНФ-II и немеченый БНФ-II (различные количества), элюировали 0,4 *М* ацетатом аммония (pH 5,7) в отсутствие растворенного конкурентного лиганда. Каждая кривая соответствует содержанию (в микрограммах) дополнительно введенного немеченого БНФ-II в зоне: *1* — 0; *2* — 6,35; *3* — 10,3; *4* — 20,7; *5* — 41,3; *6* — 82,6. Элюирование проводили при комнатной температуре [4].

пептидного лиганда в элюирующий буфер константы диссоциации димеров также могут быть определены для нейрофизина, частично или полностью связанного с лигандом. Основная кривая элюирования на рис. 10 отражает случай «близкого к насыщению» лизинвазопрессина. Для этого случая K_L гораздо меньше (большее сродство), чем в буфере без лиганда (табл. 1). Таким образом, здесь, как и в случае пептидной аффинной матрицы, зональное элюирование нейрофизина может быть использовано для измерения степени модуляции сродства в кооперативных комплексах между нейрофизинами и пептидными гормонами.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аналитическая аффинная хроматография с зональным элюированием была изучена на многих макромолекулярных системах. Было показано, что этот метод достаточно простой в экспе-

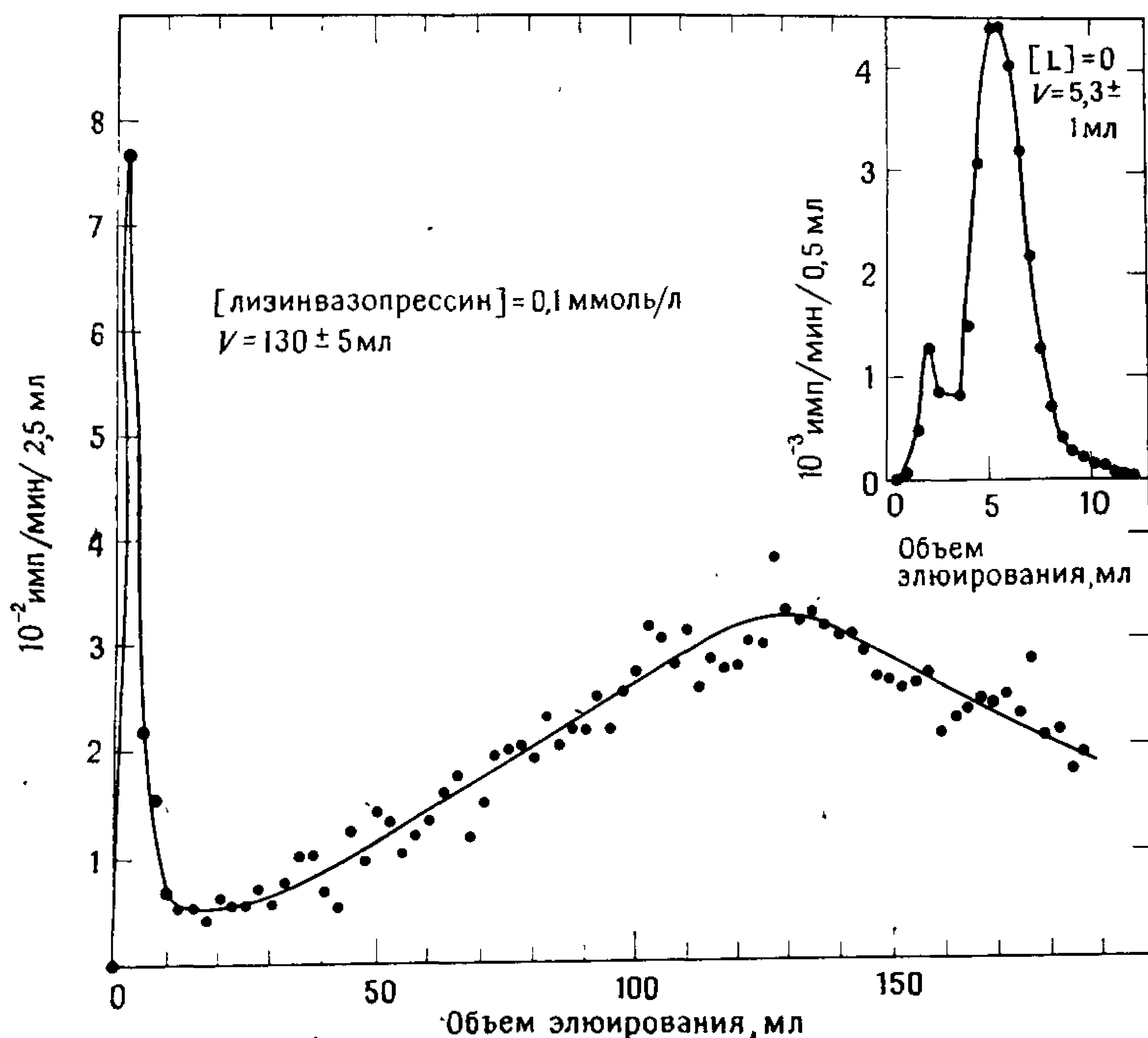


Рис. 10. Элюирование [^{125}I]-БНФ-II с БНФ-II-сефарозы в присутствии и отсутствие растворенного пептидного лиганда — лизинвазопрессина. Зоны (300 мкл), содержащие ~1 мкг [^{125}I]-БНФ-II, наносили на БНФ-сефарозу (объем сорбента 1,5 мл, $[\overline{L}] = 1{,}4 \cdot 10^{-4}$ моль/л), уравновешенную 0,4 M ацетатом аммония (pH 5,7), содержащим 0,1 ммоль/л лизинвазопрессина (основной график) или в отсутствие лизинвазопрессина (график в правом верхнем углу). Объемы зонального элюирования были использованы для расчета константы диссоциации для взаимодействия белок — белок $K_{\overline{L}}$ по уравнению (3). Эти значения приведены в табл. 1 [21].

риментальном отношении и весьма полезен для оценки взаимодействий макромолекул. Все более широкое применение этого метода в нескольких лабораториях [26] отражает его потенциальные преимущества для изучения биомолекулярных взаимодействий и в этой связи молекулярных основ функционирования биологических систем.

Литература

1. *Dunn B. M., Chaiken I. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **71**, 2382 (1974).
2. *Chaiken I. M.*, Anal. Biochem., **97**, 1 (1979).
3. *Dunn B. M., Chaiken I. M.*, Biochemistry (Wash.), **14**, 2343 (1975).
4. *Angal S., Chaiken I. M.*, Biochemistry (Wash.), **21**, 1574 (1982).
5. *Chaiken I. M., Taylor H. C.*, J. Biol. Chem., **251**, 2044 (1976).
6. *Hethcote H. W., DeLisi C.*, J. Chromatogr., **248**, 183 (1982).

7. *Bender M. L., Brubacher L. J.*, Catalysis and Enzyme Action, published by McGraw-Hill Book Co., New York, 1973, p. 25.
8. *Nichol L. W., Ogston A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H.*, Biochem. J., **143**, 435 (1974).
9. *Eilat D., Chaiken I. M.*, Biochemistry (Wash.), **18**, 790 (1979).
10. *DeLisi C., Hethcote H. W.*, in: Affinity Chromatography and Related Techniques, Gribnau T., Visser J., Nivard R. (eds.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1982, p. 63.
11. *Hethcote H. W., DeLisi C.*, J. Chromatog., **240**, 269 (1982).
12. *DeLisi C., Hethcote H. W., Brettler J. W.*, J. Chromatog., **240**, 283 (1982).
13. *Wilchek M., Gorecki M.*, Eur. J. Biochem., **11**, 491 (1969).
14. *Fiske C. H., Subbarow Y.*, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
15. *Bartlett G. R.*, J. Biol. Chem., **234**, 466 (1959).
16. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. G.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **61**, 636 (1968).
17. *Cuatrecasas* P., J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
18. *Chesebro B., Metzger H.*, Biochemistry (Wash.), **11**, 766 (1972).
19. *Breslow E., Weis J., Menendez-Botet C. J.*, Biochemistry (Wash.), **12**, 4644 (1973).
20. *Chaiken I. M.*, Anal. Biochem., **97**, 302 (1979).
21. *Chaiken I. M., Tamaoki H., Brownstein M. J., Gainer H.*, FEBS Lett., **164**, 361 (1983).
22. *Fischer E. H., Curd J. G., Chaiken I. M.*, Immunochemistry, **14**, 529 (1977).
23. *Bolton A. E., Hunter W. M.*, Biochem. J., **133**, 529 (1973).
24. *Rice R. H., Means G. E.*, J. Biol. Chem., **246**, 831 (1971).
25. *Stark G. R.*, Methods Enzymol., **11**, 125 (1967).
26. *Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I.* (eds.), Affinity Chromatography and Biological Recognition, Academic Press, New York, 1983.

Глава 8.

РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛИГАНДОВ НА ТВЕРДЫХ НОСИТЕЛЯХ ЧЕРЕЗ РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СВЯЗИ РТУТЬ—СЕРА

Дж. Бонафо, Дж. Дорнанд, Дж. Фаверо, Дж.-К. Мани
(J. C. Bonnafous, J. Dornand, J. Favero, J.-C. Mani)

1. ВВЕДЕНИЕ

Для понимания многих биологических явлений необходимо выделение субпопуляций клеток, находящихся на различных стадиях дифференцировки и в различных формах специализации. Разделение клеток особенно важно для изучения иммунной системы, состоящей из множества клеток, обладающих специфическими фенотипами и функциями. Основные методы основываются на наличии специфических компонентов на поверхности выделяемых клеток, например рецепторов лектинов, антигенов, иммуноглобулинов. Их развитию в большой степени способствовала возможность получения моноклональных антител против детерминант клеточной поверхности.

Выделение клеток с флуоресцентными активированными клеточными сортерами (ФАКС) требует дорогостоящего оборудования и малопригодно для рутинных экспериментов, особенно при необходимости получения большого числа клеток. Следовательно, существует необходимость в более широко доступных и воспроизводимых методах разделения клеток. Аффинная хроматография в принципе представляет собой идеальный метод для очистки клеток: он заключается в иммобилизации на твердых носителях лигандов, избирательно узнающих компоненты мембран.

2. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КЛЕТОК

Аффинные методы в ряде случаев были использованы в качестве средства «отрицательного» отбора, т. е. исключения специфической клеточной популяции. Однако наиболее интересная методология, относящаяся к классической аффинной хроматографии, включает «положительные» иммуноселективные процессы. В последние 15 лет были предприняты многочисленные исследования в этом направлении; их результаты обсуждались в обзорах [1—4]. Далее в общих чертах описаны лишь новей-

Таблица 1. Некоторые новейшие данные по разделению клеток аффинной хроматографией

Матрица	Иммобилизованный лиганд	Клетки, специфически адсорбированные на аффинном носителе	Способы выделения связавшихся клеток	Литература
Эритроциты быка	Антитела кролика против IgG мыши (присоединенные к эритроцитам быка с помощью хлорида хрома)	Клетки с HLA-DR-антигенами, покрытые анти-HLA-DR-моноклональными антителами	Селективный лизис эритроцитов хлоридом аммония	5
Эритроциты быка	IgG кролика против IgG мыши	T_8^+ (супрессор) и Leu-3a$^+$ (помощник) клетки предварительно покрытые OKT_8 и моноклональными антителами против Leu-3a	Лизис эритроцитов быка	6
Эритроциты быка	Антитела против IgG мыши	Подгруппы лимфоцитов человека, покрытых специфическими мышиными моноклональными антителами	Лизис эритроцитов быка	7
Эритроциты быка	Антитела кролика против Ig мыши, присоединенные к эритроцитам быка через SpA и антитела кролика против эритроцитов быка	Подгруппы лимфоцитов человека, покрытых специфическими мышиными моноклональными антителами	Описаны только эксперименты по обнаружению связавшихся клеток	8
Пластиковые пластинки	— Антитела против Ig мыши — $F(ab')_2$-фрагменты антител против Ig человека	— Выделение подгрупп Т-лимфоцитов человека, покрытых специфическими моноклональными антителами (OKT_4, OKT_8) — Фракционирование В- и Т-лимфоцитов человека	Осторожное гидростатическое давление (пипетирование)	9
Пластиковые чашки	Антитела козла против иммуноглобулина мыши	Подгруппы лимфоцитов человека (T_4^+ и T_8^+), покрытых специфическими мышиными моноклональными антителами	Механические	10
Пластиковые чашки	Антитела козла против иммуноглобулина мыши (Fc-часть)	Лимфоциты человека, обработанные OKT_4 антителами	Механические	11

Продолжение табл 1.

Матрица	Иммобилизованный лиганд	Клетки, специфически адсорбированные на аффинном носителе	Способы выделения связавшихся клеток	Литература
Пластиковые чашки	Антитела козла против Ig мыши	Ig^+ клетки селезенки мыши	Энергичное пипетирование	12
Пластиковые чашки	— Антитела кролика против Ig мыши — $F(ab')_2$ фрагмент антител кролика против Ig мыши	Ig^+ клетки селезенки мыши	Энергичное пипетирование	13
Полиакриламидные шарики	Антитела кролика против IgG мыши (ковалентно присоединенные к шарикам)	Подгруппы Т-клеток человека, меченных мышиными моноклональными OKT_4 и OKT_8 антителами	Избыток антител козла против IgG мыши	16
Шарики сефадекса	Антитела против $F(ab')_2$ человека	Очистка В лимфоцитов человека (содержащих поверхностный Ig)	Избыток Ig человека	17, 18
Шарики агарозы-полиакролеина	1) Антитела козла против IgG кролика 2) Антитела козла против Ig мыши, анти-Thy-1,2, агглютинин соевых бобов (присоединенные через полилизинглутаральдегидную вставку)	1) Эритроциты человека, обработанные антителами кролика против эрнтроцитов человека 2) Разделение В- и Т-спленоцитов мыши	Осторожное перемешивание шариков	19
Пластиковые чашки	Антитела к флуоресцеину	Фракционирование лимфоцитов человека, меченных специфнческими антителами с присоединенным флуоресцеином: — Т-клетки фага-помощника, меченные анти-Leu-3a — супрессорные Т-клетки, меченные анти-Leu-2a-моноклональными антителами — клеточные линии T-ALL, меченные анти-T-ALL-антителами	Обращение связывания с флуоресцеин-L-лизином+ '+осторожное отсасывание	14, 15

Матрица	Иммобилизованный лиганд	Клетки, специфически адсорбированные на аффинном носителе	Способы выделения связавшихся клеток	Литература
Сефароза 6 МВ	Ковалентно связанный белок А	— В-лимфоциты человека, меченные флуоресцеинированными антителами против Ig человека — Тимоциты мыши, обработанные анти-θ-Ig кролика — Лимфоциты селезенки мыши, обработанные антителами кролика против Ig мыши	Избыток IgG собаки или механическая обработка	20
Пластиковые трубки	Ig человека (иммобилизован на пластиковых трубках карбодиимидным методом) + белок А + антитела против специфической антисыворотки	Лимфоциты периферийной крови человека, инкубированные со специфической антисывороткой	Соскабливание с поверхности иммуноадсорбента	21
Пластиковые чашки	IgG (присоединен к чашкам карбодиимидным методом) + белок А + антисыворотка, специфичная для антигенов клеточных мембран (сыворотка кролика против аллотипа)	Субпопуляция лимфоцитов кролика	Соскабливание с поверхности иммуноадсорбента	22
Пластиковые чашки	Гаптенированный желатин (ДНФ-желатин), адсорбированный на пластике	Клетки селезенки, связывающие антиген	Плавление желатина, затем ферментативное расщепление ДНФ-желатина коллагеназой	26
Найлоновые диски; шарики латекса	ДНФ, иммобилизованный химически однозначным методом через S—S-связи	Клетки селезенки, связывающие антиген	— термические — расщепление S—S-связи 10 мМ меркаптоэтанолом	29
Пластиковые чашки, покрытые желатином	Фосфорилхолин, связанный с желатиновым покрытием через S—S-связь	Клетки селезенки, связывающие антиген	Расщепление S—S-связи 50 мМ дитиотреитолом	30

шие из предложенных методов (табл. 1), три из которых получили наиболее широкое применение.

1) *Розеточные методы* [4—8]: фиксация антимышиных иммуноглобулинов на эритроцитах быка (с помощью хлорида хрома) и обработка в розетках выделяемыми клетками, предварительно покрытыми специфическими моноклональными антителами (продуцируемыми мышиной гибридомой); выделение связавшихся клеток достигается селективным лизисом эритроцитов.

2) *Чашечные методы* [9—15]: адсорбция антител на полистирольных чашках (химически неопределенным способом); наиболее часто используются методы двойных антител, т. е. пластиковые чашки, покрытые антителами против мышиных иммуноглобулинов, селективно связывают клетки, предварительно обработанные специфическими моноклональными антителами.

3) *Методы с использованием белка А из Staphylococcus aureus* [8, 20—23]. Белок А обладает свойством теоретически обратимо связывать Fc-фрагмент IgG (белок А — бивалентный); разделение клеток может быть достигнуто с иммуноглобулин-специфическими носителями, покрытыми белком А: белок А связывается или непосредственно с шариками или с пластиковыми поверхностями, покрытыми иммуноглобулином; иммобилизованный таким образом белок А может либо прямо взаимодействовать с клетками, покрытыми специфическими антителами, либо обрабатывается антителами, направленными против специфических антител, используемых для узнавания выделяемой клеточной популяции.

В аффинной хроматографии клеток обычно возникают проблемы двух основных типов:

1) неспецифическое взаимодействие между клетками и аффинными носителями;

2) Необратимость взаимодействия клеток с аффинным носителем: хотя адсорбция клеток на специфических иммобилизованных лигандах зачастую достигается легко, постоянно возникали трудности при последующем выделении связавшихся клеток с применением методов, совместимых с жизнеспособностью клеток. Одна из причин этих трудностей — многоточечное связывание между клеткой и носителем: каждая клетка обладает многочисленными рецепторами для иммобилизованного лиганда, причем несколько молекул лиганда сами связаны с одной и той же частицей матрицы или поверхности. Второй причиной необратимого связывания клеток с аффинным носителем может быть очень высокое сродство между иммобилизованным лигандом и его рецептором на поверхности клетки, которое часто возникает, если узнавание клетки и лиганда основано на взаимодействии антиген — антитело; это весьма серьезное ограничение при выделении жизнеспособных клеток иммуноаффинной хроматографией.

В некоторых случаях оказалось возможным возвратить клетки, первоначально связанные с иммобилизованными лигандами, с использованием избытка лиганда или конкурентного лиганда [16—18, 24], но эта идеальная ситуация редко реально осуществима. В большинстве случаев должны быть найдены другие возможности [1—4]: плавление носителя [25, 26], ферментативная деградация носителя [27], механическое отделение. Все эти методы могут повредить клетки. Даже пипетирование создает возможность потери рецепторов с клеточной поверхности. Якобович и др. [28] недавно использовали преимущество этого необратимого связывания клеток с аффинными матрицами для отделения лектиновых рецепторов эритроцитов механическим разрывом иммобилизованных комплексов лектинов и связавшихся клеток.

Интересным путем преодоления необратимости связывания клеток с аффинными матрицами является использование эритроцитов быка в качестве носителя (табл. 1), так как клетки могут быть выделены из розетки селективным лизисом эритроцитов.

Другая попытка была предпринята Кифером [29] и Кембьером и Нилом [30], которые выделили антигенспецифичные лимфоциты включением расщепляемого дисульфидного мостика между твердым носителем и связанными гаптенами или антигенами. Однако расщепление этих S—S-связей путем обработки тиолом иногда протекает с трудом, что вызывает необходимость дополнительной механической обработки [30].

Очевидно, что в настоящее время нет единого универсального метода для выделения клеток аффинной хроматографией, главным образом из-за того, что элюирование интактных функциональных клеток с аффинных матриц остается трудной задачей.

3. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КЛЕТОК С ЛИГАНДАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ЧЕРЕЗ РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СВЯЗИ РТУТЬ — СЕРА

С целью преодоления некоторых недостатков описанных выше методов была осуществлена иммобилизация лигандов через вставки, содержащие Hg—S-связи, расщепляемые при обработке тиолом легче, чем дисульфидные связи. Ртутьорганическое соединение мерсалил {натриевая соль *о*-[3-(гидроксимеркури)-2-метоксипропилкарбамоил]-феноксиуксусной кислоты} ковалентно связывали с активированными шариками трисакрила и полученное иммобилизованное ртутьсодержащее соединение обрабатывали лигандами с тиольными группами: образующиеся Hg—S-связи легко расщепляются под действием дитиотреитола [31].

3.1. Описание метода

3.1.1. Носитель. Носитель представляет собой трисакриловые шарики (Trisacryl GF 05, Reactifs IBF, Франция). Основная особенность этого носителя — наличие трех гидроксиметильных групп и одной алкиламидной группы на каждое основное повторяющееся звено. Благодаря этим химическим группам полимер очень гидрофилен и удобен для разделения биологических макромолекул, особенно белков, и клеток. Эта матрица имеет очевидное преимущество над носителями на основе полиакриламида или гидроксиметилметакрилата, которые обладают ярко выраженным гидрофобным характером. Кроме того, трисакриловые шарики не проявляют неспецифических взаимодействий с клетками, главным образом потому, что в отличие от классических хроматографических матриц они не содержат углеводных компонентов.

3.1.2. Активация трисакрила. Введение первичных аминогрупп в трисакриловые шарики проводят в соответствии со схемой, представленной на рис. 1, реакцией с эпихлорогидрином в присутствии тетрафторобората цинка [32] с последующей обработкой аммиаком.

Концентрация NH_2-групп, определенная фронтальным анализом, составляет ~50 мкмоль/мл геля.

3.1.3. Присоединение мерсалила к трисакрилу-NH_2. Амидная связь между карбоксильной группой мерсалила и аминогруппой

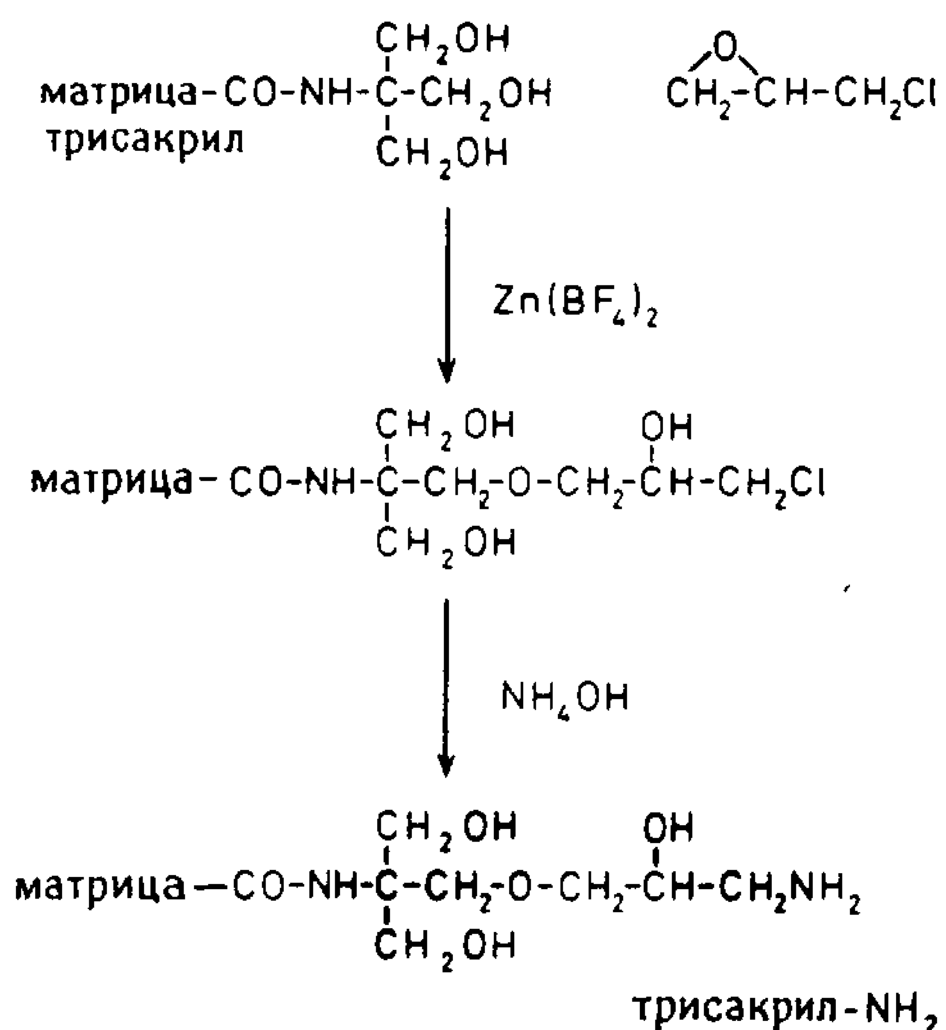


Рис. 1. Введение первичных аминогрупп в трисакриловые шарики.

матрицы образуется при действии конденсирующего агента N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина (ЭЭДХ) [33, 34] (рис. 2). Реакция конденсации осуществляется в смеси этанол — вода (1 : 1); растворимость мерсалила удовлетворительна для протекания этой реакции в отличие от других классических ртутьорганических соединений (таких, как *п*-хлоромеркурибензойная кислота).

Количество связавшегося мерсалила, определенное с использованием [^{14}C]мерсалила, составляет 0,2 мкмоль/мл геля. Число доступных молекул иммобилизованного мерсалила устанавли-

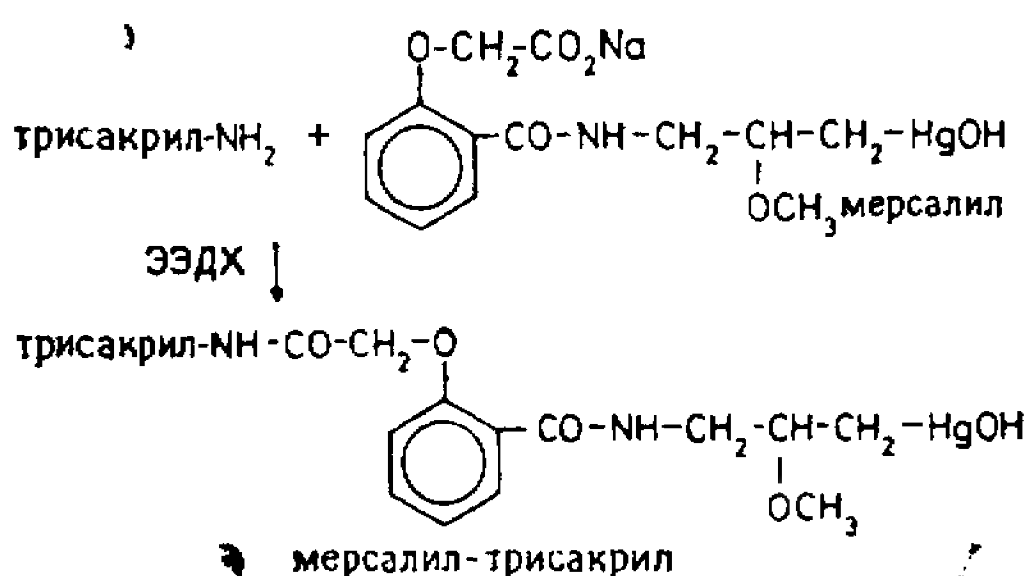


Рис. 2. Присоединение мерсалила к трисакрилу-NH_2.

вается насыщением колонок с мерсалил-трисакрилом тиосалициловой кислотой — тиолом, содержащим хромофорную группу, — с последующим элюированием связавшейся тиосалициловой кислоты при промывании колонки избытком дитиотреитола; было найдено, что матрица содержит ~0,1 мкмоль мерсалила/мл геля, что не очень отличается от величины, определенной по связыванию [^{14}C]мерсалила. Хотя количество иммобилизованного мерсалила представляется довольно низким, оно достаточно для насыщения поверхности шариков тиолированными лигандами, имеющими размер лектинов или иммуноглобулинов.

3.1.4. Тиолирование лигандов и иммобилизация тиолированных лигандов на мерсалил-трисакриле. Лиганды [конканавалин А (Con A), антитела] могут быть тиолированы, как описано в работе [35], с использованием S-ацетилмеркаптоянтарного ангидрида (S-АМЯА) в качестве тиолирующего агента (рис. 3).

Иммобилизацию на мерсалил-трисакриле через Hg—S-связь можно осуществить, как показано на рис. 3. Первые эксперименты по иммобилизации [31] были осуществлены путем одновременного смешивания S-ацетилпроизводного лиганда, мерсалил-трисакрила и гидроксиламина и получения in situ SH-функциональных групп модифицированного лиганда [35]. Однако S-ацетилированный лиганд может реагировать непо-

средственно с иммобилизованным мерсалилом без восстановления гидроксиламином S-ацетильной группы [31], что исключает возможное окисление SH-групп.

Степень тиолирования лиганда (контролируется путем определения SH-групп классическим методом [36] после обработки S-ацетилпроизводного гидроксиламином [35]) можно задавать, подходящим образом регулируя концентрацию лиганда и S-АМЯА. Если степень тиолирования лиганда слишком высо-

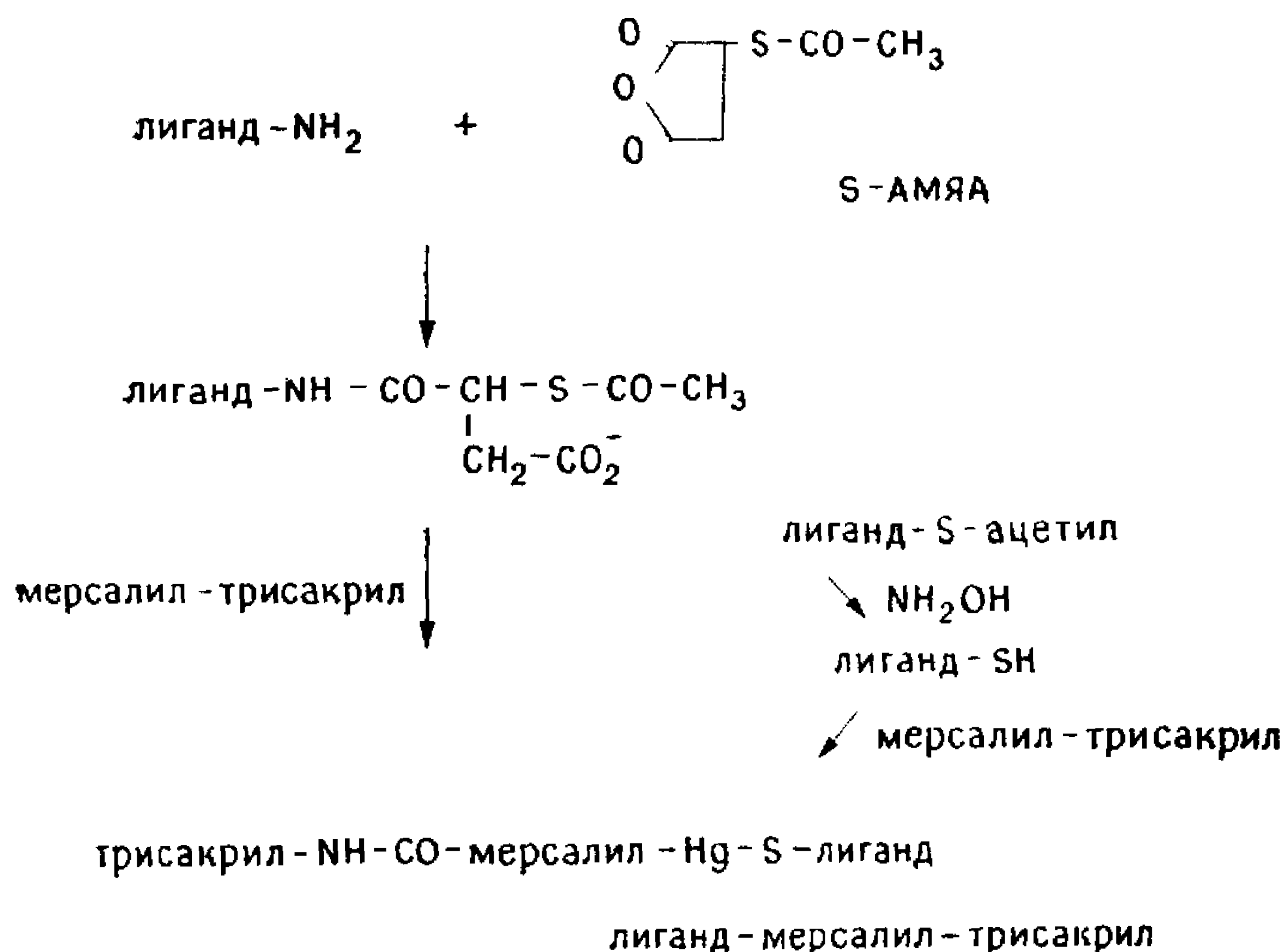


Рис. 3. Иммобилизация лигандов на мерсалил-трисакриле.

ка, то возникают затруднения при удалении с носителя клеток, первоначально связавшихся с носителем: это обусловлено, вероятно, дополнительным многоточечным связыванием между лигандом и молекулами мерсалила на носителе. Степень иммобилизации лиганда может быть определена при помощи радиоактивно меченных лигандов ([^{3}H]конканавалин А, ^{125}I-меченный IgG).

3.1.5. Связывание клеток с лиганд-мерсалил-трисакриловыми носителями. Возврат клеток обработкой тиолами. Клетки, обладающие поверхностными компонентами, узнающими иммобилизованный лиганд, инкубируются с лиганд-мерсалил-трисакриловым гелем и различными контрольными гелями. Возврат связавшихся клеток достигается путем обработки тиолом. Принцип выделения клеток с использованием лиганд-мерсалил-трисакрила изображен на рис. 4.

В результате обработки тиолом клетки выделяются с молекулами лиганда, моновалентно связанными с поверхностью клеток. Эти молекулы лиганда могут быть либо удалены путем обработки конкурентными агентами (так, в случае лектинов комплексы разрушаются сахарами), либо поглощены клетками в результате эндоцитоза (в случае антител).

3.2. Методики

3.2.1. Введение аминогрупп в шарики трисакрила.

1) Шарики трисакрила (Trisacryl GF 05, Reactifs IBF) (30 мл) обрабатывают 25%-ным (масс./об.) тетрафтороборатом цинка (22,5 мл) и эпихлорогидрином (60 мл) в течение 3 ч при 80 °С и осторожном перемешивании.

2) Реакционную смесь охлаждают, шарики промывают дистиллированной водой и вновь суспендируют в 2,0 М аммиачном буфере (NH_4OH+NH_4Cl, pH 9,0; 100 мл).

3) Суспензию осторожно перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч и шарики тщательно промывают дистиллированной водой.

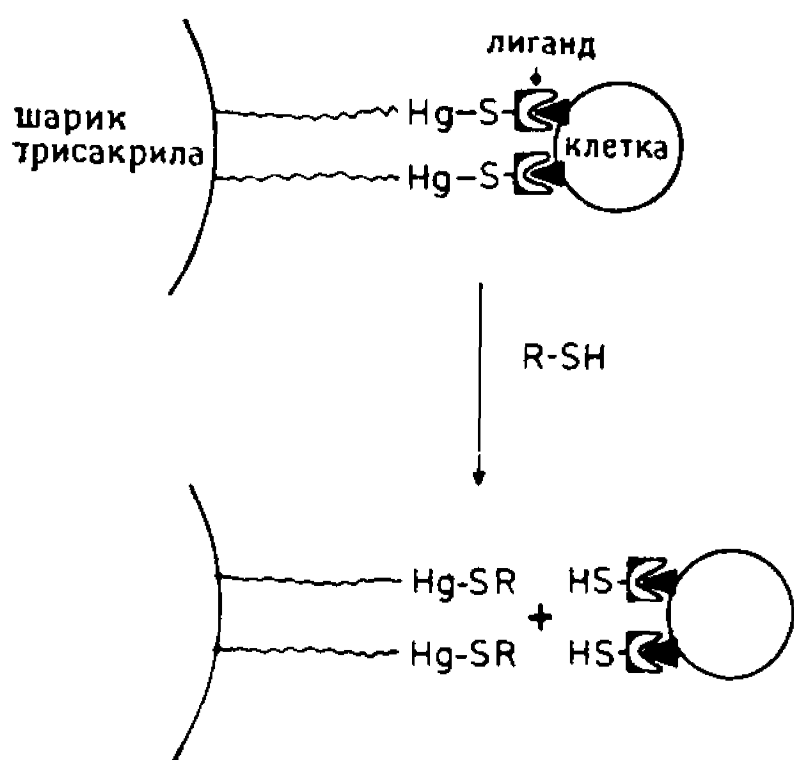


Рис. 4. Выделение клеток с использованием лиганд-мерсалил-трисакрила.

3.2.2. Иммобилизация мерсалила на шариках трисакрила-NH_2. Конденсацию проводят в смеси этанол — вода (1 : 1) по методике, описанной в работе [33].

1) К шарикам (17 мл упакованного объема) добавляют воду (13 мл) и этанол (27,5 мл).

2) Мерсалил (Sigma) (200 мг) растворяют в 0,15 М NaOH (3,3 мл), доводят pH до 7,5 с помощью 2,0 М HCl и добавляют этанол (3,4 мл). Быстро выливают полученный раствор мерсалила в этанол (2,5 мл), содержащий ЭЭДХ (Aldrich) (300 мг).

4) Энергично встряхивают в течение 2 мин и добавляют ЭЭДХ-мерсалил к шарикам трисакрила-NH_2.

5) Перемешивают смесь путем вращения в течение ночи при комнатной температуре.

6) Шарики тщательно промывают смесью этанол — вода (1 : 1) (1,5 л), водой (1 л) и 1,0 М NaCl (1 л).

Мерсалил-трисакрил должен быть защищен от света; его можно хранить в замороженном виде при —20 °С.

Использование в предыдущем эксперименте [^{14}C]карбамоилмерсалила (CEN, Saclay) позволяет определить количество иммобилизованного мерсалила. Для этой же цели можно применить следующую методику. Колонку с гелем уравновешивают в 50 мМ фосфате (pH 6,2), содержащем 0,15 моль/л NaCl и 1% (об./об.) луброла РХ, и насыщают 20 мМ тиосалициловой кислотой; связавшуюся тиосалициловую кислоту элюируют 20 мМ дитиотреитолом в том же буфере и определяют количество элюированной тиосалициловой кислоты методом УФ-спектрофотометрии.

3.2.3. Тиолирование лиганда.

1) К 1 мл раствора лиганда, содержащего 1—2 мг лектина (или антитела) в 1 мл 125 мМ фосфатного буфера (pH 7,0), добавляют свежеприготовленный раствор S-АМЯА (Sigma) (50—100 мМ) в диметилформамиде (20 мкл раствора S-АМЯА на 1 мл раствора лиганда).

2) Осторожно перемешивают смесь путем вращения в течение 2 ч при комнатной температуре.

3) Для удаления непрореагировавшего S-АМЯА проводят диализ против 125 мМ фосфатного буфера (pH 7,0) или гель-фильтрацию через небольшую колонку трисакрила GF 05, уравновешенного тем же буфером.

4) Для измерения степени тиолирования лиганда S-ацетилпроизводное лиганда обрабатывают гидроксиламином (добавляют до конечной концентрации 20 ммоль/л) в течение 1 ч при комнатной температуре и определяют содержание SH-групп по методике, описанной в работе [36]. Для этого добавляют равный объем 2 мМ дитиопиридина в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,0) и измеряют увеличение оптической плотности при 343 нм (молярный коэффициент экстинкции продукта реакции — тиопиридона — составляет $8{,}08 \cdot 10^3$); измерение надо проводить сразу же после добавления раствора дитиопиридина ввиду медленной реакции последнего с гидроксиламином.

3.2.4. Иммобилизация лиганда на мерсалил-трисакриле.

1) S-Ацетилпроизводное лиганда (0,5÷2 мг/мл; в 125 мМ фосфатном буфере, pH 7,0) смешивают с равным объемом упакованных шариков мерсалил-трисакрила в том же буфере.

2) Смесь перемешивают (путем вращения) в течение 12—16 ч при комнатной температуре в темноте.

3) Гель тщательно промывают фосфатным буфером, затем 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), содержащим 0,5 М NaCl.

4) Шарики вновь суспендируют в среде, выбранной для связывания клеток.

Контрольные эксперименты показывают, что нетиолированный лиганд не присоединяется к шарикам. Однако для неко-

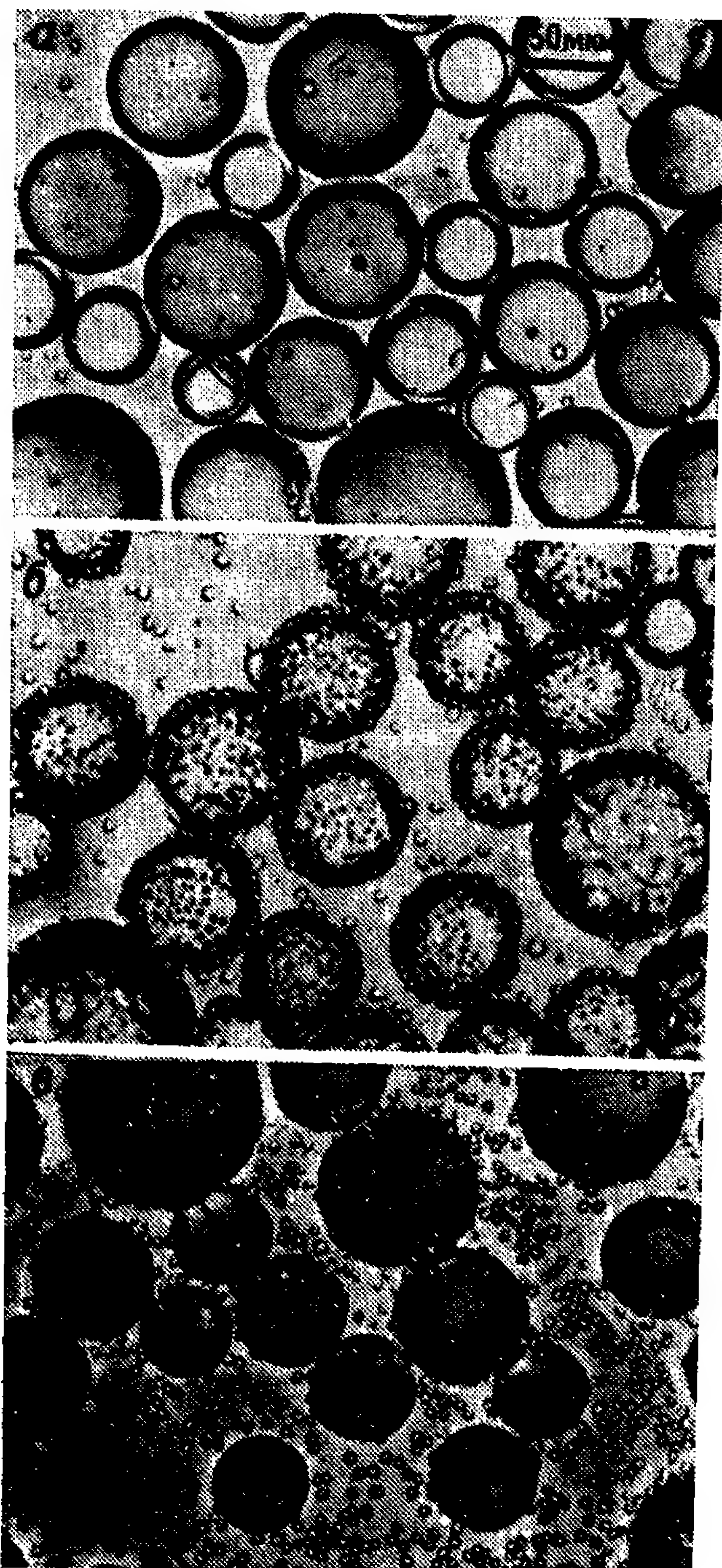


Рис. 5. Связывание тимоцитов мыши с Con A-мерсалил-трисакрилом. Тимоциты мыши инкубировались в течение 20 мин при комнатной температуре с Con A-мерсалил-трисакриловыми гелями или с различными контрольными гелями ($5 \cdot 10^7$ клеток в 250 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl на 100 мкл геля). После удаления несвязавшихся клеток повторным промыванием шарики были исследованы под оптическим микроскопом. *а* — контрольные гели (трисакрил, трисакрил-NH_2, мерсалил-трисакрил без Con A, мерсалил-трисакрил, предварительно обработанный нетиолированным Con A, или трисакрил-NH_2, предварительно обработанный Con A-S-Ac); *б* — Con A-мерсалил-трисакрил; *в* — Con A-мерсалил-трисакрил после связывання тимоцитов и обработки 50 мМ дитиотреитолом, 2%-ным метил-α-D-маннопиранозидом в 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl в течение 30 мин при комнатной температуре при очень осторожном перемешивании.

торых рядов антител может иметь место слабое связывание (наблюдаемое по последующему связыванию клеток) в результате неспецифических взаимодействий или нежелательных (неизвестных) реакций мерсалила с белками; это связывание можно подавить включением бычьего сывороточного альбумина (0,5% масс./об.) в процессы иммобилизации.

3.2.5. Связывание клеток с лиганд-мерсалил-трисакриловыми гелями. Возврат связавшихся клеток обработкой тиолом. Поскольку на колонках может механически задерживаться значительное количество клеток, предпочтительнее применять бетч-метод.

1) Лиганд-мерсалил-трисакриловый гель (контрольный гель) диспергируют в сосуде с большой поверхностью, распределяя шарики по поверхности.

2) Гели инкубируют с клеточной суспензией при периодическом и очень осторожном перемешивании.

3) После удаления несвязавшихся клеток и повторного осторожного промывания часть шариков переносят в счетную камеру для микроскопического исследования.

4) Для удаления связавшихся клеток шарики обрабатывают раствором, содержащим тиол, при периодическом осторожном перемешивании.

3.3. Применения

Далее описаны три модельных исследования, демонстрирующие возможности этой методологии.

3.3.1. Связывание тимоцитов с Con A-мерсалил-трисакрилом. Элюирование дитиотреитолом. Первоначальные эксперименты были проведены с СПТП-тиолированным Con A [31], хотя впоследствии было обнаружено, что метод с использованием S-АМЯА более удобен. Растворы Con A (Pharmacia) (2 мг/мл) тиолируют, как указано в разд. 3.2, с использованием 1—2 ммоль/л S-АМЯА (конечная концентрация); это приводит к введению 1,5÷3,3 S-ацетильных групп на молекулу Con A. Количество иммобилизованного Con A, определенное с [^{3}H]Con A (фирма NEN), составляет ~60 мкг/мл геля.

Тимоциты мыши инкубируют с Con A-мерсалил-трисакрилом или с различными контрольными гелями. После 20 мин инкубации с последующим промыванием для удаления несвязавшихся клеток, шарики исследуют под оптическим микроскопом (рис. 5). На рис. 5, *а* приведены результаты, полученные с контрольными гелями. Ни в одном случае не было обнаружено значительного связывания тимоцитов с шариками, что свидетельствует об отсутствии сколько-нибудь значительного неспецифического взаимодействия матрицы на основе трисакрила с клетками и об отсутствии неспецифически адсорбированных на шариках Con A-S-Ac или нетиолированного Con A.

На рис. 5, *б* показаны Con A-мерсалил-трисакриловые шарики, полученные, как описано выше, после инкубации с тимоцитами мыши: шарики покрыты клетками. Связавшиеся клетки не элюируются 2%-ным (масс./об.) метил-α-D-маннопиранозидом, который специфически связывается с Con A.

Возврат связавшихся тимоцитов легко достигается при обработке 50 мМ дитиотреитолом, содержащим метил-α-D-маннопиранозид (2%-ным масс./об., добавлен для предотвращения вы-

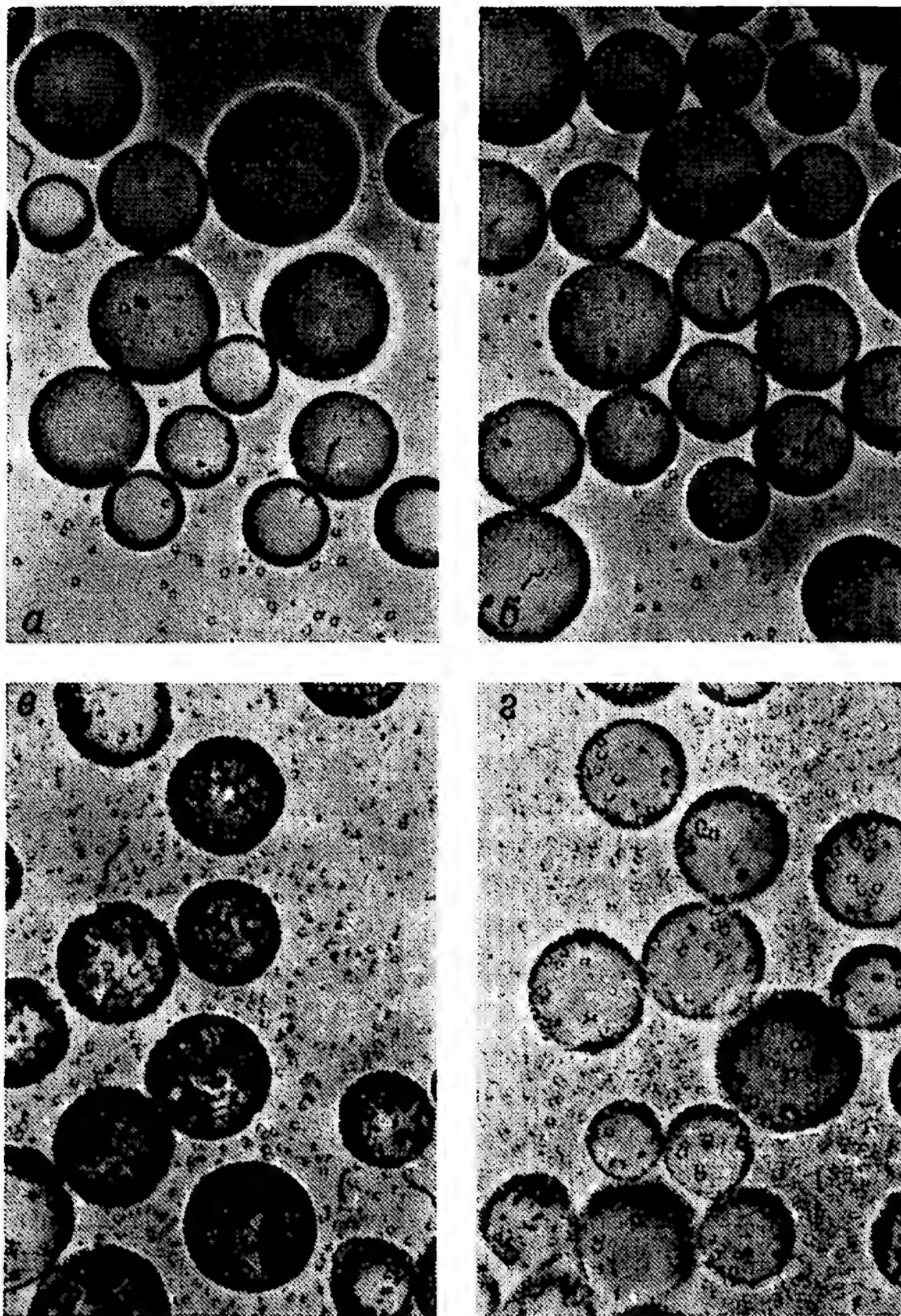


Рис. 6. Связывание ТНБС-меченых эритроцитов с анти-ДНФ-мерсалил-трисакрилом. Эритроциты барана инкубировались в течение 20 мин при комнатной температуре с анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловыми гелями или различными контрольными гелями ($2 \cdot 10^8$ клеток в 250 мкл 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl на 100 мкл геля) в сосудах с большой поверхностью при очень осторожном периодическом перемешивании. После удаления несвязавшихся клеток промыванием шарики исследуют под оптическим микроскопом. *а* — анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловые шарики+немеченые эритроциты; *б* — ТНБС-меченые эритроциты+мерсалил-трисакриловые шарики, предварительно обработанные нетиолированными анти-ДНФ; *в* — анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловые шарики+ТНБС-меченые эритроциты; *г* — диссоциация ТНБС-меченых эритроцитов, первоначально связавшихся с анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловыми шариками, после 30-минутной обработки 50 мМ дитиотреитолом в 10 мМ трис-HCl, 0,12 M NaCl (pH 7,5).

зываемой Con A агглютинации элюированных клеток). На рис. 5, *в* представлены тимоциты, диссоциированные с аффинного носителя после 30-минутной обработки этим элюентом. Около 70% связавшихся клеток элюируется за 30 мин, а при более продолжительной обработке могут быть удалены все клетки. Можно показать, что элюированные дитиотреитолом тимоциты жизнеспособны, так как они не поглощают трипан голубой и нормально стимулируются Con A, что продемонстрировано экспериментами по включению [^{3}H]тимидина [31].

3.3.2. Связывание ТНБС-меченых эритроцитов с анти-ДНФ-мерсалил-трисакрилом. Возврат обработкой тиолом. Эксперимент состоит в иммобилизации тиолированных анти-ДНФ-антител на мерсалил-трисакриле и связывании ТНБС-меченых эритроцитов барана, узнаваемых анти-ДНФ-антителами.

1) Раствор (1 мг/мл) моноклональных анти-ДНФ-антител (поставляется Clin Midy-SANOFI Research Center) тиолируют по методике, описанной в разд. 3,2, используя 1—2 мМ S-АМЯА; это приводит к введению 1,7—3,5 S-ацетильных групп на молекулу антитела.

Количество связавшихся антител, определенное с ^{125}I-мечеными антителами, должно составлять ~1 мкг/мл геля.

2) Эритроциты барана обрабатывают тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС) по методике, описанной в работе [37].

3) ТНБС-меченые эритроциты барана инкубируют с анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловыми гелями или различными контрольными гелями в сосуде с большой поверхностью при периодическом осторожном перемешивании.

4) После инкубации в течение 20 мин и удаления несвязавшихся клеток путем многократного промывания шарики исследуют под оптическим микроскопом.

На рис. 6, *а* приведены анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловые шарики, инкубированные с немечеными эритроцитами; эритроциты не связываются с носителем. ТНБС-меченые эритроциты, инкубированные с мерсалил-трисакрилом, предварительно обработанным нетиолированными анти-ДНФ, показаны на рис. 6, *б*; связывание клеток не происходит, что указывает на отсутствие неспецифической адсорбции антител на шариках. На рис. 6, *в* показаны анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловые шарики, инкубированные с ТНБС-мечеными эритроцитами; шарики полностью покрыты эритроцитами, которые не элюируются при промывании. На рис. 6, *г* представлена диссоциация ТНБС-меченых эритроцитов, первоначально связавшихся с анти-ДНФ-мерсалил-трисакриловыми шариками, после 30-минутной обработки 50 мМ дитиотреитолом. Все клетки элюируются, гемолиза эритроцитов не наблюдается. Количество эритроцитов, связавшихся с матри-

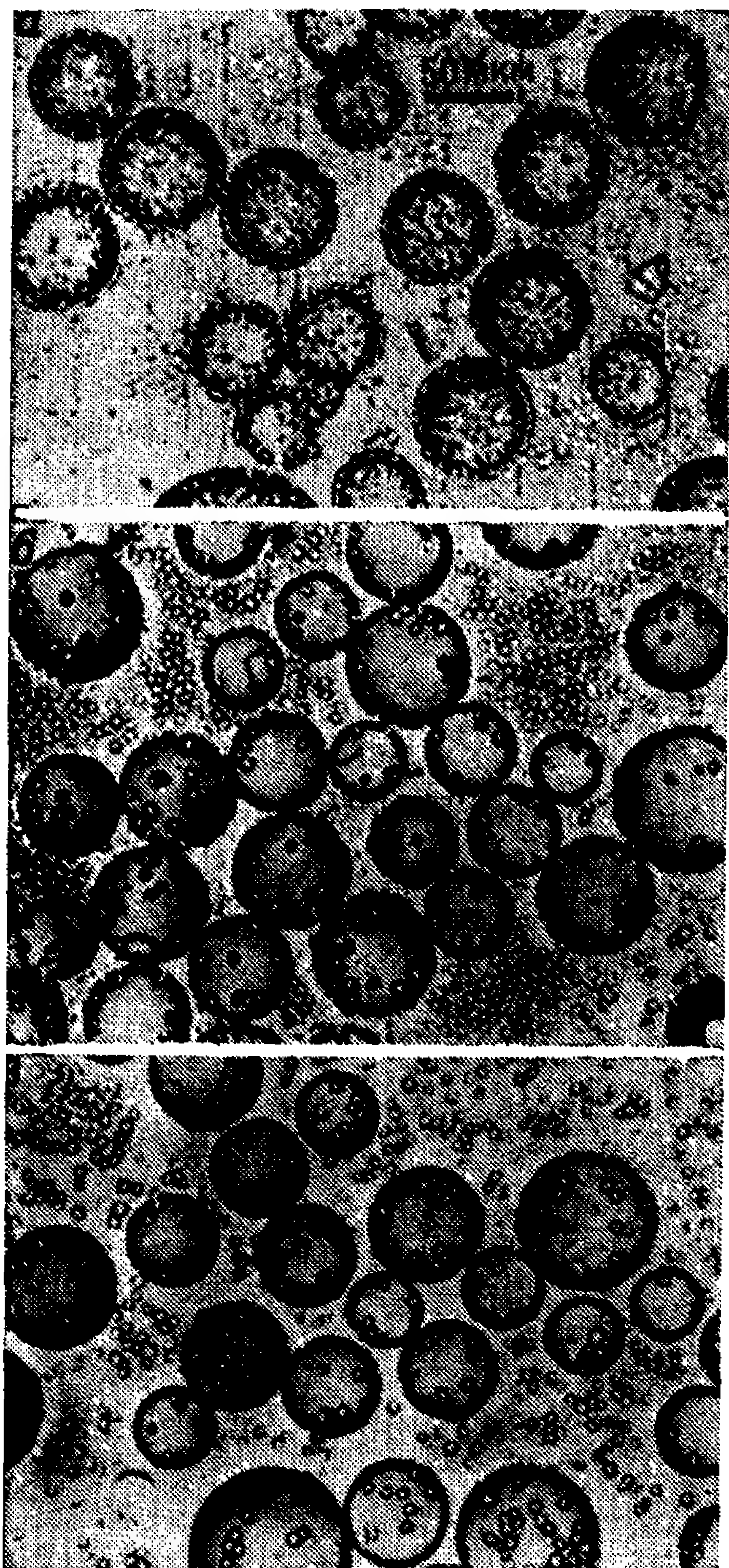


Рис. 7. Связывание тимоцитов мыши с анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрилом. Тимоциты мыши инкубировались в течение 2 ч при 4 °С с анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрилом в среде Хенка, содержащей 0,1% (масс./об.) БСА и 0,1% (масс./об.) азида натрия (10^8 клеток в 250 мкл среды на 50 мкл геля). После удаления несвязавшихся клеток промыванием шарики исследовали под оптическим микроскопом. *а* — анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрил + тимоциты Thy-1,2-положительной линии мышей (C 57/BL6); *б* — анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрил+Thy-1,2-положительные тимоциты после 2-часовой обработки 25 мМ дитиотреитолом в среде Хенка; *в* — анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрил+тимоциты Thy-1,1-положительной линии мышей (C 57/KA).

цей и элюированных расщеплением Hg—S-связи тиолом, составляет 10^9/мл геля.

3.3.3. Связывание тимоцитов мыши с анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрилом. Элюирование дитиотреитолом. Первые результаты были получены с иммобилизованными антителами, узнающими природные антигены клеточной поверхности [38].

1) Раствор (2 мг/мл) моноклональных анти-Thy-1,2-антител (поставляется Clin-Midy-SANOFI Research Center) тиолируют по методике, описанной в разд. 3.2, используя 1 мМ S-АМЯА (конечная концентрация).

2) Полученное S-ацетилпроизводное обрабатывают в течение

16 ч при комнатной температуре в темноте равным объемом мерсалил-трисакрила.

3) Анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакриловый гель инкубируют с тимоцитами мыши в течение 2 ч при 4 °С в среде Хенка, содержащей 0,1% (масс./об.) БСА и 0,1% (масс./об.) азида натрия.

На рис. 7, *а* показано связывание тимоцитов из Thy-1,2-положительной линии мышей (С 57/BL 6): эти тимоциты были элюированы в жизнеспособном состоянии при 2-часовой обработке 25 мМ дитиотреитолом в указанной выше среде (рис. 7, *б*). Связывание тимоцитов с анти-Thy-1,2-мерсалил-трисакрилом было специфичным, поскольку тимоциты из Thy-1, 1-положительной линии мышей (С 57/КА из лаборатории д-ра Боннье, Льеж) не адсорбировались на том же аффинном носителе (рис. 7, *в*).

4. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Развитие методов разделения клеток с помощью аффинной хроматографии в значительной степени задерживалось ввиду трудностей возврата клеток, связавшихся с аффинными носителями. Хотя для решения этих проблем были предложены различные подходы, до сих пор не найдено единого универсального метода. В этой главе рассмотрен метод с использованием расщепляемых вставок: матрица представляет собой трисакриловые шарики, не взаимодействующие с клетками. Ртутьорганическое соединение мерсалил ковалентно иммобилизуют на матрице в результате простой химической реакции, и после этого лиганды, тиолированные продажным гетеробифункциональным реагентом (S-АМЯА), реагируют с иммобилизованным мерсалилом: образующаяся Hg—S-связь может быть расщеплена при действии тиола легче, чем дисульфидная связь, что особенно важно, когда имеется возможность мультивалентного связывания тиолированного лиганда с матрицей.

Предварительные результаты подтверждают, что процесс, заключающийся в иммобилизации антител против иммуноглобулинов мыши на мерсалил-трисакриле и выделении клеток, предварительно покрытых специфическими моноклональными антителами мыши, может применяться как общий метод. Этот процесс, уже использованный в «чашечных методиках», требует лишь небольших количеств указанных моноклональных антител (Бонафо и др., неопубликованные данные). Этот метод имеет хорошие перспективы использования для разделения подгрупп специфических клеток и выделения антигенспецифических лимфоцитов.

5. БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим д-ра Г. Видаля и д-ра П. Понцелета (Clin-Mindy-SANOFI Research Center, Montpellier) за предоставле-

ние моноклональных антител и полезные дискуссии и Р. Ларгье и Н. Бернада за квалифицированную техническую помощь. Эта работа получила финансовую поддержку от Direction du Development Scientifique et Technologique et de l'Innovation (грант № 82.V.0016), Centre National de la Recherche Scientifique и Fondation pour la Recherche Médicale Française.

Литература

1. *Edelman G. M., Rutishauser U.*, in: Methods in Enzymology, Vol. 34, Jakoby N. B., Wilchek M. (eds.), Academic Press, New York, 1974, p. 195.
2. *Haas W., von Boehmer H.*, in: Current Topics in Microbiology and Immunology: Techniques for Separation and Selection of Antigen Specific Lymphocytes, Haas W., von Boehmer H. (eds.), Springei Verlag, New York, 1978, p. 1.
3. *Sharma S. K., Mahendroo P. P.*, J. Chromatogr., **184**, 471 (1980).
4. *Basch R. S., Berman J. W., Lakow E.*, J. Immunol. Methods., **56**, 269 (1983).
5. *Stocker J. W., Garotta G., Hausmann B., Trucco M., Ceppellini R.*, Tissue Antigens, **13**, 212 (1979).
6. *Egeland T., Lea T.*, J. Immunol. Methods., **55**, 213 (1982).
7. *Mills K., Armitage R., Worman C.*, Immunol. Lett., **6**, 241 (1983).
8. *Karavodin L. M., Golub S. H.*, J. Immunol. Methods., **61**, 293 (1983).
9. *Tsoi M. S., Aprile J., Dobbs S., Goehle S., Storb R.*, J. Immunol. Methods., **53**, 293 (1982).
10. *Reinherz E. L., Penta A. C., Hussey R. E., Schlossman S. F.*, Clin. Immunol. Immunopathol., **21**, 257 (1981).
11. *Payne S. M., Sharrow S. O., Shearer G. M., Biddison W. E.*, Int. J. Immunopharmacol., **3**, 227 (1981).
12. *Mage M. G., McHugh L. L., Rothstein T. L.*, J. Immunol. Methods, **15**, 47 (1977).
13. *Wysocki L. J., Sato V. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **75**, 2844 (1982).
14. *Fong S., Tsoukas C. D., Pasquali J. L., Fox R. I., Rose J. E., Raiklen D., Carson D. A., Vaughan J. H.*, J. Immunol. Methods, **44**, 171 (1981).
15. *Fong S., Fox R. I., Rose J. E., Liu J., Tsoukas C. D., Carson D. A., Vaughan J. H.*, J. Immunol. Methods, **46**, 153 (1981).
16. *Braun R., Teute H., Kirchner H., Munk K.*, J. Immunol. Methods, **54**, 251 (1982).
17. *Chess L., McDermott R. P., Schlossman S. F.*, J. Immunol., **113**, 1113 (1974).
18. *Anderson K. C., Griffin J. D., Bates M. P. M., Slaughenhoupt B. L., Schlossman S. E., Nadler L. M.*, J. Immunol. Methods, **61**, 283 (1983).
19. *Margel S., Ofarim M., Eshhar Z.*, J. Cell Sci., **62**, 149 (1983).
20. *Gheti V., Mota G., Sjoquist J.*, J. Immunol. Methods., **21**, 133 (1978).
21. *Bundesen P. G., Gordon J.*, J. Immunol. Methods, **30**, 179 (1979).
22. *Nash A. A.*, J. Immunol. Methods, **12**, 149 (1979).
23. *Langone J. J.*, J. Immunol. Methods, **55**, 277 (1982).
24. *Hellstrom U., Hammarstrom S., Dillner M. L., Perlmann H., Perlmann P.*, Scand. J. Immunol., **5**, 45 (1976).
25. *Rutishauser U., d'Eustachio P., Edelman G. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **70**, 3894 (1973).
26. *Haas W., Layton J. E.*, J. Exp. Med., **141**, 1004 (1975).
27. *Schlossman S. F., Hudson L.*, J. Immunol., **110**, 149 (1973).
28. *Jakobovitz A., Eshdat Y., Sharon N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **100**, 1484 (1981).
29. *Kiefer H.*, Eur. J. Immunol., **5**, 624 (1975).
30. *Cambier J. C., Neale M. J.*, J. Immunol. Methods., **51**, 209 (1982).

31. *Bonnafous J. C., Dornand J., Favero J., Sizes M., Boschetti E., Mani J. C.*, J. Immunol. Methods, **58**, 93 (1983).
32. *Hubert P., Mester J., Dellacherie E., Neel J., Beaulieu E. E.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **75**, 3143 (1978).
33. *Boschetti E., Corgier M., Garelle R.*, Biochimie, **60**, 425 (1978).
34. *Pougeois R., Satre M., Vignais P. V.*, Biochemistry (Wash.), **17**, 3018 (1978).
35. *Klotz I. M., Heiney R. E.*, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 605 (1962).
36. *Grasetti D. R., Murray J. F., Jr.*, Arch. Biochem. Biophys., **119**, 41 (1967).
37. *Rittenberg M. B., Pratt K. L.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **132**, 575 (1969).
38. *Bonnafous J. C., Dornand J., Favero J., Mani J. C., Boschetti E.*, in: Affinity Chromatography and Biological Recognition, Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. (eds.), Academic Press, Inc., London and New York, in press (1983).

Дополнительная литература

Черкасов И. А. Успехи химии, 1972, т. 41, с. 1911.
Клящицкий Б. А., Шапот В. С. Успехи биологической химии, 1976, т. 17, с. 234.
Клящицкий Б. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 485.
Лозинский В. И., Рогожин С. В. Успехи химии, 1980, т. 49, с. 879.
Веса В. С. Прикл. биохимия и микробиол., 1980, т. 16, с. 629.
Песлякас И.-Г. И., Суджювене О. Ф., Глемжа А. А. Прикл. биохимия и микробиол., 1981, т. 17, с. 456.
Клящицкий Б. А., Кузнецов П. В. Успехи химии, 1984, т. 53, с. 1740.
Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1984, т. 10, с. 293.
Остапенко О. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорган. химия, 1986, т. 12, с. 1445.
Клящицкий Б. А., Межова И. В., Швец В. И. Успехи биологической химии, 1986, т. 27, с. 187.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авидин 121
Агар-агар 12
Агароза 11
аденозинмонофосфат *см.* AMP
алкиламино 179—187
алкогольдегидрогеназа 75
альбумин 75, 135, 142—149
амино 55
аминоалкил 86
аминобензамидин 62
аминогексаноил-NAD 109
аминогексил 66
аминогексил-AMP 177
амннофенилборная кислота 171—173
аминоэтиламид 77
анилин 61
антигены 121, 151—162, 243—260
антитела 138, 151—162, 243—260
— фрагменты 70
антифлуоресцеин 245
аспартатаминотрансфераза 141
ацилазидо 88
белки 88, 135
белок A 246
бромоцианактивация 48—52, 135
бычий нейрофизин II 234
галактозидаза 73
гаптены 246
гексаметилендиамин 61
гемоглобин 138
гепарин 151, 162—171
гидразидо 87, 88
гидрофобная 16, 179—187
гидроксисукцинимидные эфиры 55
гидроксисукцинимидо 85, 86
глутатион 97
глюкозооксидаза 73
диазоний 91
ДНК 130—132, 134
ДНФ 246
имидазол 62, 149
казеин 162—171
карбоксидециламино 207
карбоксиметил 77—80
КДИ-активация 63
конканавалин A 150, 152, 250, 254
красители 173—177
липаза 137
магнитная 19
макроглобулин 139
недостатки 13
нуклеиновые кислоты 132
нуклеотиды 227
оксирановая активация 52—55
олиго(dT) 132
пепсин 137, 140, 141
полинуклеотиды 131
поли(U) 133, 134
поперечно-сшитая 14, 15
рибонуклеаза 137
содержание серы 12
структура 12—14
структурная единица 12
сукциниламино 87
сульфонилхлориды 74—76
тиопропил 98
трипсин 75
триптофаназа 141
2,4,6-трифторо-5-хлоропиримидин, активация 58—63
уреаза 37, 38, 73, 139
фенил 184
фосфорилхолин 207, 228, 235—237, 246
цибакрон голубой 110, 112, 173—177
шарики, получение 15—18
этантиол 62
AMP 104—111, 177—179
Fab 244, 245
Fc 244
IgG 70, 135, 145, 244—246
Met-Tyr-Phe-аминогексил 234
NAD 109
PdTpAP 234

Аденозинмонофосфат 104
Адипоилгидразид 87
Азокрасители 92, 95, 173—177
Азосочетание 32, 95
Акридин желтый 175
Акриламидные гели 175
Активация матриц азокрасителями 92—97
— — ацилазидная 87
— — бромоциановая 48—52, 135, 154
— — введением диазониевых групп 90
— — N-гидроксисукцинимидом 55
— — глутаровым альдегидом 88
— — дивинилсульфоном 90
— — изохлорокарбонатная 65
— — карбонилдиимидазольная 63, 64
— — методом смешанных ангидридов 65, 66
— — оксирановая 52—55, 99, 100
— — периодатным окислением 66
— — полиизоцианатная 71
— — сульфонилхлоридная 74
— — тозилом 76
— — трезилом 76
— — триазиновая 56—58
— — 2,4,6-трифторо-5-хлоропиримиднном 58—63
— — эпихлорогидрином 98
Активация, методики 48—83
Аланин, присоединенный к CNBr-активированной агарозе 51
Алкиламино-агарозы 179—187
— элюирование белков 183, 184
Алкиламиногруппы 102
Алкилирование восстановительное 230
Алкогольдегидрогеназа 75, 105, 117
Аллергены 119
Альбумин иммобилизованный 71—75, 142—149
Альдолаза 207—209
Алюминия оксид (пористый кимал) 37—40
Амилаза 24, 25
Аминоарил-сефароза 96
Аминоарил-целлюлоза 93
Аминобензамидин 62
Аминобензамидогексил-агароза 91
Аминогексил-агароза 66
Аминогексил-АМР-сефароза 104, 105, 177—179
Аминогруппы определение 81
Аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланил, метиловый эфир 188
— колонки с сепароном 188
Аминометилпропандиол 172
Аминонитробензол 91
Амино-сферон 140
Амино-трисакрил 249
Аминофенилборная кислота 58, 171—173
Аминофениллактозид 119
Аминоэтиламид-агароза 77
Аминоэтилкарбамилметил-агароза 78—81
Амины, определение 102
Амфолит 121
S-АМЯА 249—260
Анализ, элементный 100
адсорбентов 100—103
3,6-Ангидро-L-галактоза 12
Анилин, иммобилизация 61
Антигены 68
иммобилизованные 121, 153—162
Анти-ДНФ 90, 256
Анти-стероид 120
Антитела, иммобилизация 67, 138, 151—162, 250
— выделение 121
Антитимоциты 258
Антиконканавалин А 120
Анти-F(ab)-сефароза 70
Анти-Fc-сефароза 70
Ароил-DL-аминокислоты, расщепление 148
Ароматические сульфоксиды, расщепление 149
Аспартатаминотрансфераза 141
Ацетилмеркаптоянтарный ангидрид 250
Ацетил-DL-триптофан, расщепление 149
— этиловый эфир, расщепление 149
Аффинные колонки крупномасштабные 122

Белки, иммобилизация на агарозе 135
Белок А 246
Бензамидин 91
Бензоил-DL-аминокислоты 148
Бензоиларгинин-*п*-нитроанилид 124
Бензохинон 85
Бетч-методы для колонок с иммобилизованным гепарином 167
Биогель Р 23, 89
Биотин 121
Бисоксираны 52—55, 85, 131; *см. также* Эпихлорогидрин и эпоксидактивированная сефароза
Бифункциональные поперечно-сшивающие агенты 38, 84
Борогидрид натрия 66
Бромоциан 48—52, 154
— активация с титрованием 49, 50, 135

БСА-силикагель 142—149
1,4-Бутандиолдиглицидиловый эфир 52, 131
н-Бутиламин 63
Буфер, изменение 118
Буферы для использования с гепариновыми колонками 164
Бычий сывороточный альбумин 27
Бычий нейрофизин II 231, 234
Bacillus stearothermophilus 110

Варфарин 149
Вирус 119
Витамин B_{12}, иммобилизация 189
— связывание белков 189
Время инкубации 105
Вставки 62
бутиламин 63
глицилглицин 62
гексаметилендиамин 61
Вторая константа равновесия 213
Вудворда реагент 85
Высокоэффективная жидкостная хроматография 33, **42**, **124—128**, 142

Галактоза, ангидро-L-галактоза 12
Галактозидаза 75, 119
Галофильные бактерии 185, 186
Гексаметилендиамин 35
— присоединение к ФХП-агарозе 61
Гексаметилендиизоцианат 85
н-Гексанол 35
Гексокиназа 117
Гели, солюбилизация 100
Гемагглютинин *Lens culinaris* 56
Гемоглобин человека 27, 138, 182
A_1c 36
Гепарин, буферы 166
— методика для хроматографии 165—167
— на сефарозе 162—171
— — ультрогеле 151
— — эупергите 151
Гетеробифункциональные реагенты 84
Гидразидо-агароза 87, 88
Гидразидные шарики полистирольные 142
Гидроксиалкилметакрилатные гели 28
Гидроксибензойная кислота 136
Гидроксикинуренин 149
N-Гидроксисукциниламидосукцинил-агароза 55
N-Гидроксисукцинимидные эфиры агарозы 55, 86
активация 85
сукциниламино-агароза 55
5-Гидрокси-DL-триптофан 149
Гидролиз 101
Гидрофобная хроматография 109, 179—187
применение 184—187
Гистонкиназа 166
Гликогенсинтетаза 182
Гликогенфосфорила *b* 182
Гликопротеины 173
Глицерокиназа 105—107, 110, 111
Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа 112, 113, 118
Глюкозооксидаза, иммобилизация 32, 75
Глобулин, связывающий половой гормон 120
Глутаматдегидрогеназа 108, 114, 144—145
γ-Глутамилтрансфераза 151—162
из гепатомы крысы 161
— коровьего молока 160
— почки быка, легкая форма 157, 159
— — — тяжелая форма 157, 158
— — крысы 160
— — мыши 161
Глутаральдегид 33, 88, 89
Глутатион-агароза 97
Гонадотропин хориона человека 95, 96
Градиенты температуры 117
Гуанидиевые соли 119
ГХЧ-сефароза 95, 96
HbA_1c 110
HLA 244

Давления перепад 123
Декстран 22
Десорбция, методы 113—122
— непрореагировавшего лиганда 131
— электрофоретическая 131
Деформирующие буферы 184
Диазо-агароза 91
Диазоний-агароза 91
Дивинилсульфон 85, 90
Дигидрофолатредуктаза 108
Диметиладипимидат 85
Диолсвязанный силикагель 42—46
Дипиридиндисульфид 72
Дитионит 96

Дитиотреитол 98
Дифференциальный анализ 100
Дициклогексилкарбодиимид 132
Диэтиладипат 87
ДНК-зависимая РНК-полимераза 162—171
ДНК, разделение 175—177
ДНК-целлюлоза 130—132
ДНФ-DL-аминокислоты, расщепление 148
ДНФ-лизин 119

Емкость определение 226

Зональное элюирование, методики в аффинных разделениях 199, 200
— — примеры 233—241

Изомеры оптические 142—149
Изомочевинные группы 48, 49
Изоферменты, из слюны 40
— панкреатического происхождения 40
Изохлорокарбонатная активация 65
Изоцитратдегдирогеназа 108, 112
Изоэлектрическое фокусирование 121
Имидазол, иммобилизация 62
— присоединенный к ФХП-агарозе 62
Имидазолилкарбамат 64
Иминокарбонаты 50
Иммобилизация глюкозооксидазы 32
— с использованием сульфонилхлоридов 74
— тозила 76
— трезила 76
— трипсина 32
Иммобилизованные лиганды
аденозинмонофосфат *см.* AMP
алкиламино 180—184
алкогольдегидрогеназа 75
альбумин 73, 135, 142—149
амино 55
аминобензамидин 62
аминогексаноил-NAD 109
аминогексил 66
аминогексил-AMP 177—179
аминофенилборная кислота 171—173
аминоэтиламид 77
анилин 61
антигены 121, 138, 151—161, 241—260
антитела 138, 151—161, 241—260
— фрагменты 70
антифлуоресцеин 245
аспартатаминотрансфераза 141
белки 38, 135
белок А 246
БНФ II 229
галактозидаза 75
гаптены 246
гексаметилендиамин 61
гемоглобин 138
гепарин 151, 162—171
N-гидроксисукцинимидный эфир 55
гидроксисукцинимид 85, 86
глутатион 97
глюкозооксидаза 75
ДНК 130, 132, 134
ДНФ 246
имидазол 62
ингибиторы 187
казеин 162—171
карбоксидециламин 207
карбоксиметил 79
конканавалин А 150, 250, 253
красители 173—177
лектины 149
липаза 137
α_2-макроглобулин 139
нуклеиновые кислоты 132
нуклеотиды 227
олиго(dT) 132
пепсин 137, 140, 141
поли(U) 133
полинуклеотиды 132
рибонуклеаза 137
сульфонилхлориды 74
тиопропил 98
трипсин 73, 136
триптофаназа 141
уреаза 37—39, 75, 139
фосфорилхолин 207, 228, 235—237, 246
цибакрон голубой 110, 112
этантиол 62
AMP 104—111, 177—179
Fab 244, 245
Fc 244
IgG 135, 142, 244—246
Met-Tyr-Phe-аминогексил 229
NAD 109
pdTpAP 227
Иммобилизованный лиганд, отщепление 48
Иммуноадсорбенты 67, 154—161
элюенты 119
Иммуноглобулин А 207

Иммуноглобулин человека 64
Инкубации время 105
Инсулин 64, 119
Интерферон кролика 112
— фибробластов 112
Иодид 119
Иодирование 231
Ионная сила 112, 113, 116
IgA 207, 228, 230, 235—237
IgG 119, 120, 142, 154—161

Казеин-сефароза 162—171
методика использования 168—171
Карбамилирование 230, 231
Карбодиимиды 84, 132, 133
водорастворимые 132, 140
как конденсирующие агенты 132
Карбоксидециламнно-сефароза 200, 206, 211
Карбоксиметилирование 77
Карбокси-сферон 140
N,N′-Карбонилди-1,2,3-бензотриазол 63
Карбонилдиимидазол, активация 63, 64
N,N′-Карбонилди-1,2,4-триазол 63
Каррагинан 12
Кимал пористый (оксид алюминия) 37
Киназы белок 162—171
— гистоновые 166
Кинуренин, расщепление 149
Кислотный гидролиз гелей 101
Клетки разделение 243—260
возврат 247, 248
клетки-помощники 244
В-лимфоциты 244
Т-лнмфоциты 246
примеры 244—246
связывание с гелями 254
селезенки 245
спленоциты 245
Т-супрессор 244
тимоциты 246
Клострипаин 183
Количественные аспекты аффинной хроматографии 192—241
Коллагеназа 183
Колонки, влияние размера 104
— для высокоэффективной хроматографии 124
— крупномасштабные 122
— упаковка 125, 144
Комплемент человека 119
Конканавалин А 150, 152, 251, 255
Конструирование колонок для высокоэффективной хроматографии 124
Концентрация доступных положений 207
— лиганда 100—103, 196, 202
Коэффициент вязкости В 116
Красители, иммобилизация 95, 173—175
— колонки 15, 110, 112, 113, 173—175
— специфичные к основанию 176
Крупномасштабные колонки 122

Лактатдегидрогеназа 104—109, 111, 200, 207, 211
Левафикс бриллиантовый красный 93, 95
Лектин 149—151
Лиганд для иммобилизации 130
— конкурентный 113
— концентрация на сорбенте 100, 104, 181, 195, 202
— мерсалил-трисакрил 249
— отщепление 103
— радиоактивно меченный 230
— связанный через Hg—S-связь 241—246
— тиолирование 250
Лизоцим 204
Лимфоциты Т- и В- 244, 246
— фактор увеличения колонии 184
Линейные градиенты температуры 117
Липаза 137
Липопротеин 119
Leuconostos mesenteroides 22, 115

Магногель 19, 29
Макроглобулин 139
Малатдегидрогеназа 186
Малахитовый зеленый 175
Матрекс, гель 171
Матрекс оранжевый, гель 112—115
Матрицы 11—46
агароза 11
введение вставок 84
гидроксиалкилметакрилаты 28
декстран 22
клетки 244—246
магногель 19, 29
оксид алюминия 37—40
пластиковые пластинки 244
пластиковые чашки 244, 245
полиакриламид 245

поливинилацетатэтиленовые трубки 29—33
сепарон 187, 188
сефадекс 245
сефароза 11, 245, 246
стекло 134
сферическая целлюлоза 19
трисакрил 24—28
ультрогель 29
целлюлоза 19
эупергит С 33—37, 136
CNBr-активированные 48
Меркаптопуринрибозид 177
Мерсалил 248—260
Мертиолат 95
Метионил-тирозил-фенилаланил-аминоалкил-агароза 229
Мини-колонки 124—128
Морские водоросли 11
Мочевина 119
Мультивалентность растворенного вещества 194—203
Муравьиная кислота 119

Найлон 15, 139
Натрия борогидрид 66
— додецилсульфат 119
— цианоборогидрид 66
Нейрофизины 229—231, 237—241
Неорганический носитель 37—40
Нингидрин 61, 172
п-Нитробензоилазид 91
Носители, коммерческие источники 15, 16
— неорганические 37—40
— регенерация 170
— хранение 170
Нуклеаза стафилококков 227, 233—235
Нуклеиновые кислоты, иммобилизация 130
Нуклеозиды 173
Нуклеотиды 227
NAD-агароза 90, 109
NH_2-сферон 140

Объем элюирования 196
Оксираны, агароза 53, 54
— акриловые шарики (эупергит С) 33, 53, 135
— активация агарозы 53
— удаление избыточных групп 35
Олиго(dT)-целлюлоза 132
Определение емкости 226
— концентрации лиганда 102, 181, 227
Оптические изомеры 142—149
Отщепление присоединенного лиганда 48

Пепсин 137, 140, 187
Перегородки цилиндрические 122
Переход раствор — гель 20
Периодатное окисление 66—71
сефарозы 68
целлюлозы 67
Пиридилдитиопропионовой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир 79
Пиридиндисульфид 99
Пленочные носители 108
Плотность лигандов 181; см. также Концентрация лигандов
Полиакриламид, агарозные гели 29
— гели 22—24
— производные 23, 24, 88
Поливинилацетатэтиленовые трубки, иммобилизация ферментов 30
Поливиниловый спирт 30
Полиизоцианатная активация целлюлозы 71
Полимеразы РНК ДНК-зависимые 162—171
Полинуклеотиды, иммобилизация 131
Полистирольные шарики 142
Поли(U), агароза и целлюлоза 133, 134
Помощники клетки 244
Поперечная сшивка матриц 14, 84—90
Присоединение аланина к агарозе 51
— *м*-аминофенилборной кислоты к бумаге 58
— антител к трисакрилу 249—251
— буфер 135
— выход 64
— гемагглютининов к агарозе 56
— гепарина к агарозе 165
— ГХЧ к агарозе 96
— к вставкам 84
— — оксиран-агарозе 53
— конканавалина А к трисакрилу 250
— красителей к агарозе **173—177**
— к ФХП-агарозе
— — — анилина 61
— — — гексаметилендиамина 61
— — — имидазола 62
— с карбодиимидами 132
— IgG к полистиролу 142; *см. также* Агароза, Активация и т. п.
Пропанол 147
Протеинкиназы очистка 162

Процион желтый 116
— красный 115
pH, влияние 109, 118

Радиоактивные методы определения концентрации лиганда 101
Разделение клеток 241—260
Распределительное равновесие, эксперименты 200—202
Раствор — гель, переход 20
Растворенное вещество мультивалентное 194, 206
Расщепление оптическое на иммобилизованном БСА 142
Реагенты хаотропные 119
Реактигель 64
Регенерация носителей 156, 170, 176
Регенерированная целлюлоза 92
Рестриктирующие ферменты 162
Ретроградиент 118
Рибонуклеаза 137
РНК-полимеразы очистка 162
— характеристика 169
Розеточные методы **247**

Свободный лиганд, концентрация 202
Селезенки клетки 245
Сепарон 187
Сера — ртуть-связи 241—246
Сервахром 16
Сефадекс 22, 39, 68, 203, 245
Сефароза 16, 39, 90
азокрасители
— активация 92
алкиламино 179—187
аминогексил-АМР 177—179
гепарин 162—171
казеин 162—171
карбоксидециламино 207
клетки 244
периодатное окисление 67
полиизоцианатная активация 71—74
фосфорилхолин **207, 235**
эпоксиактивированная 52, 131, 172
4B 59
CL 79
CL 6B 68
pdTp-аминофенил 227; *см. также* Агароза, Матрицы и т. п.
Силанизация 43
Силикагель диолсвязанный 42—44
— колонки 142—149
— свойства 39
Скорость потока 105
— — влияние на перепад давления 25
Солюбилизация гелей 100
Соматомаммотропин 119
Спектрофотометрия гелей 100
Спленоциты 245
СПТП-эфиры 79
Стафилококков нуклеаза 227
Стекло с контролируемым размером пор 15, 41, 71, 75, 140
Сукцинимидилгидроксииодофенилпропионат 231
Сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат 79
Сульфоксиды, расщепление 147—149
Сульфонилхлориды, активация матриц 74
Супероза 6B, свойства 18
Супрессоры клетки 244
Сферическая целлюлоза 19
получение 20
свойства 20, 21
Сферон 15, 28, 140
COOH- 140
Температура, градиенты 117
— низкая 117
— эффекты 109

Тетрафтороборат 249
Тимоциты, очистка 253—256
Тиол-агароза 97
Тиол, обработка для возврата клеток 251
Тиопропил-агароза 98
Тиоцианат 119, 138
Тиреоглобулин 64
Тиреоидстимулирующий гормон 64
Титрование при активации 49
Тозил, использование для иммобилизации 76
Толуолдиизоцианат 85
ТНБС 102
ТНБС-меченные эритроцнты, очистка 256
Трезил, использование для активации 76
Триазин 31, 56
активированая бумага 58
активированные гели 56, 173
Тринитробензолсульфонат 102
Трипсин, адсорбенты для очистки 62, 122
— иммобилизация 32, 75, 136
Триптофана производные, расщепление 149
Триптофаназа 141
Трис 48, 118, 172

Трисакрил 24
аминогруппы введение 27, 252
диэтиламиноэтил, емкость 27
использование для разделения клеток 248—260
карбоксиметил, емкость 27
получение шариков 27
применение в высокоэффективной хроматографии 25
2,4,6-Трифторо-5-хлоропиримидин 58
2,4,6-Трихлоро-симм-триазин 31, 56

Уксусная кислота 119
Ультрафильтрация 15
Ультрогель 15, 29, 75
гепарин 151
полиизоцианатная активация 75
Упаковка вакуумная суспензионная 127, 144
суспензионная 127
сухая 127
Уреаза иммобилизованная 37, 39, 73, 74, 139

Фактор увеличения колонии лимфоцитов, очистка 184
Фенилаланиловые матрицы 187
Фенилборная кислота 15, 104, 110, 131—133
Фенилборонат-эупергит 36
Фениловый нейтральный красный 175
Фенил-сефароза 16, 184, 185
Фенпрокумон, расщепление 149
Ферменты
глюкозооксидаза 32
иммобилизация 29
трипсин 32
Ферментативный гидролиз 101
Ферритин 120
Формил-DL-триптофан, расщепление 149
Фосфорилаза 182, 184
Фосфорилхолин 228, 235
Фосфоцеллюлоза 207—209
Фронтальный анализ 192—216
Фурцелларан 12
Fab 234

Хаотропные реагенты 14, 119
Хлороуксусная кислота 79
Хранение аффинных адсорбентов 170, 174
Хроматография на иммобилизованных красителях 110; *см. также* Красители

Целлюлоза
активация периодатом 67
— полиизоцианатом 71—74
аминоарил 93
ДНК- 130, 132
КМ- 130
олиго(dT) 132
поли(U) 133
микрокристаллические домены 21
получение 19, 20
регенерированная 92
свойства 20—22
сферическая 19—22
Цианоборогидрид натрия 66
Цианурхлорид 85
Цибакрон голубой иммобилизованный 110, 112, 115, 173—177
Цинк тетрафтороборат 249
Цитохром *с* 27

Чашечные методы 247

Шарики полистирольные 142
Шиффовы основания 66

Электрофоретическая десорбция 119
Элементный анализ 101
Элюенты 119
Элюирование 113
зональное 217—241
изменение буфера 116
ионная сила 116
конкурентное 113
контроль 231
коферментами 114
методы 112—122
объем 196
температура 117
фронтальное 192
хаотропными реагентами 119
электрофоретическое 119
Эндопротеиназы 139
Энзакрил, производные 23
АА- 24

Эпихлорогидрин 14, 22, 98, 187, 249
Эпоксиактивированная сефароза 6В 35
Эпоксидактивированная сефароза 52
Эритроциты 255
Эстрадиол-6-карбоксиметилоксим-БСА, получение 65
Этантиол 62
Этиленгликоль 112
Этилендиамин 79
Эупергит С 16, 33
реакции с амино-АФБК 172
— — белком 34, 75, 135
— — гемоглобином 138
— — гепарином 151
— — липазой 137
— — меркаптанами 34
— — пепсином 137
— — рибонуклеазой 137
— — трипсином 136
ЭЭДХ 151, 250

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчика 5
Предисловие 7
Авторы 9
Принятые сокращения 10
Основы техники безопасности 10

Глава 1. Получение матриц и их применение 11

1. Введение 11
2. Агароза 11
   2.1. Структура агарозы 12
   2.2. Получение поперечно-сшитой агарозы 14
   2.3. Получение агарозных шариков 15
   2.4. Методика получения агарозных шариков 17
   2.5. Свойства суперозы 6В, агарозного геля для высокоэффективной аффинной хроматографии 18
   2.6. Магнитная агароза (магногель) 19
3. Целлюлоза 19
   3.1. Сферическая целлюлоза. Введение 19
   3.2. Получение сферической целлюлозы 19
   3.3. Свойства сферической целлюлозы 20
4. Декстран 22
5. Полиакриламид 22
6. Трисакрил 24
   6.1. Получение трисакрилового полимера в форме шариков . . 27
   6.2. Введение аминогрупп на шарики трисакрила (трисакрил-NH_2) 27
7. Гидроксиалкилметакрилатные гели 28
8. Полиакриламид-агарозные гели 29
9. Иммобилизация ферментов на трубках из поливинилацетатэтилена 29
   9.1. Введение 29
   9.2. Методы получения реакционноспособных трубок из поливинилацетатэтилена 30
   9.3. Иммобилизация ферментов на поверхности активированных трубок 32
10. Эупергит С 33
   10.1. Реакции эупергита с белком 34
   10.2. Образование производных эупергита С с низкомолекулярными соединениями 34
11. Гранулированный пористый оксид алюминия 37
   11.1. Введение 37

11.2. Получение иммобилизованных смесей (общая методика) . . 38
11.3. Результаты и обсуждение 38
12. Стекло с контролируемым размером пор 41
13. Диолсвязанный силикагель 42
13.1. Введение 42
13.2. Материалы 43
13.3. Методы 43
13.4. Обсуждение 44
13.5. Определение содержания диола в диолсвязанном силикагеле методом периодатного окисления 44
Литература 4

Глава 2. Методы активации 48

1. Бромоциан 48
1.1. Присоединение вставок к матрицам 48
1.2. Метод активации с титрованием 49
1.3. Стадия присоединения 50
1.4. Другой метод активации 51
2. Методы, основанные на активации оксиранами 52
2.1. Введение 52
2.2. Оксирановая активация агарозы 53
3. Гидроксисукциниламидосукцинил-агароза 55
3.1. Аминирование эпоксиактивированной агарозы до амино-агарозы 55
3.2. Получение N-гидроксисукцинимидного эфира агарозы . . 55
3.3. Активация сукциниламино-агарозы N-гидроксисукцинимидом 56
3.4. Присоединение гемагглютинина из *Lens culinaris* к активированной агарозе 56
4. Триазиновая активация агарозы 56
4.1. Замечания 57
4.2. Присоединение этилендиамина или алифатического диамина к триазинактивированной агарозе 57
4.3. Триазиновая активация фильтровальной бумаги . . . 58
4.4. Присоединение *м*-аминофенилборной кислоты к триазинактивированной бумаге 58
5. Активация агарозы 2,4,6-трифторо-5-хлоропиримидином . . . 58
5.1. Методические указания 58
5.2. Присоединение гексаметилендиамина к ФХП-агарозе . . 61
5.3. Присоединение анилина к ФХП-агарозе 61
5.4. Присоединеиие имидазола к ФХП-агарозе 62
5.5. Присоединение этантиола к ФХП-агарозе 62
5.6. Присоединение глицилглицина/*п*-аминобензамидина к ФХП-агарозе (биоспецифический адсорбент для трипсина) . . 62
6. Карбонилдиимидазольная активация 63
6.1. Активация сефарозы CL 6B карбонилдиимидазолом . . 63
6.2. Присоединение лигандов к активированным матрицам . . 63
6.3. Рекомендованный метод для применения коммерчески доступной КДИ-активированной агарозы 64
7. Активация с использованием метода смешанных ангидридов 65
7.1. Получение 17β-эстрадиол-6-(О-карбоксиметил)оксима — БСА 65
7.2. Получение изохлорокарбонатактивированных матриц . . 65
8. Периодатное окисление 66
8.1. Получение аминогексил-агарозы 66
8.2. Периодатная активация целлюлозы 67
8.3. Получение иммуноадсорбентов с очень низким неспецифическим связыванием с использованием окисленной периодатом поперечно-сшитой сефарозы 67

8.4. Присоединение антител и антигенов к окисленной с помощью периодата сефарозе CL 6B 68
9. Полиизоцианатная активация гидроксилсодержащих полимеров 71
9.1. Некоторые сведения об используемых матрицах . . . 71
9.2. Методика активации на примере сферической целлюлозы 71
9.3. Методика присоединения 72
9.4. Сравнение с другими методами присоединения 73
10. Иммобилизация с использованием органических сульфонилхлоридов 74
10.1. Введение 74
10.2. Методика 76
11. Введение функциональных групп в агарозные шарики путем карбоксиметилирования и образования аминоэтиламидного производного 77
11.1. Введение 77
11.2. Методика 79
11.3. Заключительные замечания 82
Литература 83

Глава 3. Поперечно-сшивающие агенты для присоединения вставок к матрицам 84

1. Введение 84
2. Методы присоединения нуклеофильных лигандов к карбоксилатсодержащим матрицам с использованием карбодиимидов . . 84
3. Получение гидроксисукцинимид-агарозы 85
3.1. Присоединение лигандов к агарозе, содержащей гидроксисукцинимидные сложноэфирные группы 86
4. Получение сукцинилированной аминоалкил-агарозы 86
4.1. Получение N-алкиламин-агарозы 86
4.2. Сукцинилирование 87
5. Ацилазидная активация 87
5.1. Получение гидразидо-агарозы 87
5.2. Получение ацилазидо-агарозы 88
6. Иммобилизация белков на полиакриламидных шариках с использованием глутарового альдегида 88
6.1. Получение и активация шариков 88
6.2. Активация шариков 89
7. Методики присоединения с использованием дивинилсульфона 90
7.1. Активация агарозных шариков 90
7.2. Присоединение к дивинилсульфон-агарозе 90
8. Методики присоединения, основанные на использовании диазониевых групп 90
8.1. Получение NAD-агарозы 90
8.2. Получение диазоний-агарозы 91
9. Присоединение лигандов через реакционноспособные азокрасители 92
9.1. Получение регенерированной целлюлозы 92
9.2. Определение содержания целлюлозы в суспензии регенерированной целлюлозы 92
9.3. Присоединение реакционноспособного азокрасителя к регенерированной целлюлозе и восстановление до аминоарил-целлюлозы 93
9.4. Диазотирование аминоарилцеллюлозы и присоединение белков 93
9.5. Присоединение гонадотропина хориона человека к сефарозе CL 4B с использованием активации реакционноспособным азокрасителем 95
10. Получение тиол-агароз 97
10.1. Активированная глутатион-агароза 97

10.2. Получение тиопропил-агарозы 98
Литература 99

Глава 4. Методики проведения эксперимента 100

1. Определение концентрации лиганда на сорбенте 100
1.1. Дифференциальный анализ 100
1.2. Спектрофотометрия гелей 100
1.3. Солюбилизация гелей 100
1.4. Кислотный или ферментативный гидролиз 101
1.5. Элементный анализ 101
1.6. Радиоактивные методы 101
1.7. Определение аминов с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) 102
1.8. Определение алкиламиногрупп, присоединенных к CNBr-активированной агарозе 102
2. Отщепление лиганда 102
3. Влияние концентрации лигандов 104
4. Влияние размеров колонки 104
5. Влияние скорости потока и времени инкубации 105
6. Влияние pH и температуры 109
6.1. Влияние pH 109
6.2. Влияние температуры 110
7. Ионная сила 112
8. Методы десорбции 113
8.1. Конкурентное элюирование лигандом 113
8.2. Элюирование коферментами 114
8.3. Изменение ионной силы 116
8.4. Изменение растворителя 116
8.5. Элюирование путем изменения температуры 117
8.6. Изменение буфера и/или pH 118
8.7. Хаотропные реагенты 119
8.8. Электрофоретическая десорбция 119
9. Использование цилиндрических перегородок в крупномасштабных аффинных колонках 122
9.1. Введение 122
9.2. Результаты и обсуждение 124
10. Изготовление и использование мини-колонок для высокоэффективной аффинной хроматографии 124
10.1. Изготовление колонок 125
10.2. Упаковка колонки 125
Литература 128

Глава 5. Лиганды для иммобилизации 130

1. Нуклеиновые кислоты 130
1.1. Связывание ДНК с КМ-целлюлозой 130
1.2. Иммобилизация нуклеиновых кислот на бисоксиранактивированных полисахаридах 131
1.3. Иммобилизация ДНК на целлюлозе с использованием водорастворимого карбодиимида как конденсирующего агента 132
1.4. Получение олиго(dT)-целлюлозы 132
1.5. Получение поли(U)-целлюлозы 133
1.6. Получение поли(U), присоединенной к пористым стеклянным фильтрам 134
1.7. Получение поли(U), присоединенной к CNBr-активированной агарозе 134
1.8. Получение ДНК, иммобилизованной на агароза-акриламидной матрице 134

2. Белки 135
2.1. Иммобилизация альбумина и IgG на агарозе 135
2.2. Иммобилизация белков на эупергите C (оксиран-акриловые шарики). Общая методика 135
2.3. α_2-Макроглобулин, связанный с носителем 139
2.4. Иммобилизация уреазы на найлоне 139
2.5. Иммобилизация пепсина 140
2.6. Иммобилизация аспартатаминотрансферазы 141
2.7. Иммобилизация триптофаназы 141
2.8. Присоединение IgC кролика к гидразидным шарикам . . 142
2.9. Использование колонок с силикагелем, содержащим иммобилизованный бычий сывороточный альбумин, для оптического расщепления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) 142
3. Иммобилизация лектинов 149
3.1. Иммобилизация лектинов проростков пшеницы на сефарозе 149
3.2. Иммобилизация гепарина 151
4. Очистка γ-глутамилтрансферазы иммуноаффинной хроматографией 151
4.1. Введение 151
4.2. Некоторые вспомогательные методики 152
4.3. Получение и выделение антител 153
4.4. Получение иммуноадсорбентов. Общая методика . . . 154
4.5. Очистка GGT (легкая форма) из тканей животных . . 155
4.6. Примеры 157
4.7. Заключительные замечания 162
5. Аффинная хроматография на гепарин-сефарозе и казеин-сефарозе для очистки и разделения ДНК-зависимых РНК-полимераз и протеинкиназ 162
5.1. Введение 162
5.2. Основные экспериментальные методики 163
5.3. Оборудование и биоспецифические адсорбенты для аффинной хроматографии 165
5.4. Методика хроматографии на гепарин-сефарозе 165
5.5. Методика хроматографии на казеин-сефарозе 168
5.6. Характеристика РНК-полимеразных фракций, выделенных с колонки с гепарин-сефарозой 169
5.7. Концентрирование и хранение ферментных препаратов . . 170
5.8. Регенерация и хранение аффинных адсорбентов 170
5.9. Замечания по экспериментальным методикам 170
6. Присоединение *м*-аминофенилборной кислоты к триазинактивированным носителям 171
6.1. Хроматография с использованием иммобилизованной АФБК 173
7. Применение иммобилизованных красителей 173
7.1. Получение матриц с иммобилизованными красителями 173
7.2. Хроматография ДНК на бисакриламидах с иммобилизованными красителями. Общая методика 175
8. Иммобилизация нуклеотидов 177
8.1. Получение N^6-(6-аминогексил)-5′-AMP 177
8.2. Присоединение N^6-(6-аминогексил)-5′-AMP к сефарозе 4B 179
9. Гидрофобная хроматография 179
9.1. Синтез сефарозы-C_n ($n=1\div12$) CNBr-методом 180
9.2. Синтез аминоалкил-сефарозы-C_n-NH_2 ($n=2\div12$) CNBr-методом 181
9.3. Свойства и характеристика адсорбентов 181
9.4. Выбор колонки (аффинного сорбента) для очистки конкретной системы 181
9.5. Оптимизация разделения двух ферментов 182
9.6. Выбор гомологического ряда аффинных сорбентов . . . 183

9.7. Методы элюирования 183
9.8. Примеры применения гидрофобной хроматографии . . . 184
10. Применение иммобилизованных ингибиторов в хроматографии пепсинов 187
10.1. Приготовление аффинных сорбентов 187
10.2. Хроматография пепсина свиньи на колонках с ε-аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланилметил-сепароном с различными концентрациями иммобилизованного ингибитора 188
11. Выделение белков, связывающих витамин B_{12}, с использованием аффинной хроматографии 189
11.1. Присоединение производных витамина B_{12} к 3,3′-диаминодипропиламинзамещенной сефарозе 189
Литература 189

Глава 6. Количественная характеристика взаимодействий с использованием аффинной хроматографии . . . 192

1. Введение 192
2. Основные теоретические выражения 193
2.1. Системы с одновалентным распределяющимся веществом 193
2.2. Системы с мультивалентиым растворенным веществом . . 194
3. Экспериментальные аспекты количественной аффинной хроматографии 197
3.1. Колоночная хроматография 197
3.2. Эксперименты по распределительному равновесию . . . 200
3.3. Проблема определения концентрации свободного лиганда 202
4. Анализ результатов для моновалентных растворенных веществ 203
4.1. Полный анализ конкурентной аффинной системы . . . 203
4.2. Анализ лигандзадерживаемых аффинных систем 204
4.3. Приближенный анализ результатов аффинной хроматографии 205
5. Анализ результатов для мультивалентных растворенных веществ 206
5.1. Суммарная концентрация доступных положений 207
5.2. Экстраполяция результатов к неопределенной концентрации растворенного вещества 207
5.3. Одновременное определение k_{AX} и $\bar{m}_X$ графическими методами 209
5.4. Определение $\bar{m}_X$ и k_{AX} методом минимизации стандартных ошибок 211
5.5. Системы с лигандзадерживаемым элюированием растворенного вещества 212
5.6. Определение второй константы равновесия 213
6. Значение констант равновесия для взаимодействий с матрицей 213
7. Заключительные замечания 214
Литература 216

Глава 7. Количественная аффинная хроматография с зональным элюированием и анализ молекулярных взаимодействий 217

1. Введение 217
2. Зональное элюирование в аналитической аффинной хроматографии 218
3. Использование кривых элюирования для расчета констант равновесия 222
3.1. Моновалентные системы 222
3.2. Бивалентные системы 224
4. Получение и характеристика аффинных матриц 225
4.1. Иммобилизация лиганда 225
4.2. Определение емкости 226
4.3. Примеры получения аффинных матриц 227

5. Приготовление образцов для количественной аффинной хроматографии. Контроль элюирования 230
5.1. Приготовление образцов и введение радиоизотопной метки 230
5.2. Контроль элюирования 231
6. Примеры результатов аналитической аффинной хроматографии с зональным элюированием 233
6.1. Связывание нуклеазы стафилококков с иммобилизованными нуклеотидами 234
6.2. Бивалентный иммуноглобулин А (ТЕРС 15 IgA мономер) — фосфорилхолин 235
6.3. Бычий нейрофизин II — пептиды 237
6.4. Нейрофизин — нейрофизин 240
7. Заключение 240
Литература 241

Глава 8. Разделение клеток аффинной хроматографией. Иммобилизация лигандов на твердых носителях через расщепляемые связи ртуть — сера 243

1. Введение 243
2. Современное состояние аффинной хроматографии клеток . . 243
3. Аффинная хроматография клеток с лигандами, иммобилизованными через расщепляемые связи ртуть — сера 248
3.1. Описание метода 249
3.2. Методики 252
3.3. Применения 253
4. Заключительные замечания 257
5. Благодарности 259
Литература 259

Дополнительная литература 262

Предметный указатель 263

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».